

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Aislamiento e identificación microbiana en el género *Listeria***  
**(Pirei 1940)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Lucas Dominguez Rodriguez**

DIRECTOR:

**Guillermo Suárez Fernández**

**Madrid, 2015**

TP  
1984  
097

Lucas Domínguez Rodríguez



x- 53-081766-6

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MICROBIANA EN EL GENERO  
LISTERIA (PIRIE 1940)

Departamento de Microbiología  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

97/84

© Lucas Domínguez Rodríguez

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984

Xerox 9200 XB 480

Depósito Legal: M-17645-1984

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

ASLAMIENTO E IDENTIFICACION MICROBIANA EN

EL GENERO LISTERIA (PIRIE 1940)

LUCAS DOMINGUEZ RODRIGUEZ

MADRID 1982



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA

Memoria que presenta para la  
obtención del grado de Doctor  
en Veterinaria el licenciado -  
Lucas Dominguez Rodriguez

Esta tesis doctoral ha sido rea-  
lizada en el departamento de --  
Microbiología de la Facultad de  
Veterinaria de la Universidad -  
Complutense de Madrid bajo la  
dirección del Profesor Doctor -  
Guillermo Suarez Fernandez

Madrid, 1982



A Coquelo.





## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a que este trabajo fuera una realidad

De entre ellos, quiero significar mi agradecimiento para:

El Profesor Dr. Guillermo Suarez Fernández por su apoyo y ayuda inestimable en la realización de la presente tesis, pero sobre todo por la gran confianza que me demostró en estos 5 años de trabajo.

Los Profesor Dr. H.P.R. Seeliger del Instituto de Hygiene y Microbiología de Würzburg (Alemania) y al Profesor Dr. I. Ivanov del Instituto de Investigaciones Veterinarias de Sofía (Bulgaria) por su inestimable y desinteresada ayuda.

Los veterinarios del Matadero Municipal de Madrid por su ayuda en la obtención de las muestras.

La Cátedra de Anatomía Patológica de esta Facultad y en especial a su Profesora Dra. María Castaño por su ayuda en la interpretación histológica.

La Dra. María Jesus Payá y D. Simón Vivas por su constante y desinteresada ayuda.

Los Drs. Fernando Rodríguez Ferri y Ricardo de la Fuente por las horas que se han pasado delante de los folios por mi emborronados.

A ellos y a todos mis compañeros de Departamento.

Muchas gracias.





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DON GUILLERMO SUAREZ FERNANDEZ, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

C E R T I F I C A: Que la Tesis Doctoral que lleva por título " AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MICROBIANA EN EL GENERO LISTERIA", de la que es autor el Licenciado en Veterinaria, D. LUCAS DOMINGUEZ RODRIGUEZ, se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Microbiología de esta Facultad a partir del año 1.977 y hasta el momento actual y reúne los requisitos necesarios para optar al título de Doctor en Veterinaria - de acuerdo con la legislación vigente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a veintinueve de noviembre de mil novecientos ochenta y dos.



INDICE

	<u>pág</u>
I. INTRODUCCION	
I.1. Objetivo e interés del trabajo .....	1
I.2. Antecedentes históricos .....	3
II. CARACTERISTICAS BACTERIOLOGICAS	
II.1. Morfología y estructura .....	7
II.1.1. Formas, agrupación y tinción .....	7
II.2. Composición química y propiedades bioquímicas .....	10
II.2.1. Bioquímica estructural .....	10
II.2.2. Enzimas respiratorios .....	12
II.3. Cultivo y aislamiento .....	15
II.4. Estructura antigénica e identificación serológica .....	20
II.4.1. Grupos serológicos .....	20
II.4.2. Distribución geográfica .....	21
II.4.3. Reacciones cruzadas .....	23
II.4.4. Diagnóstico serológico .....	23
II.5. Lisotipia .....	25
II.6. Prueba de CAMP .....	27
II.7. Formas degenerativas .....	29
II.7.1. Formas L .....	29
II.8. Habitat y resistencia .....	30
III. EPIDEMIOLOGIA	
III.1. Biología de la infección .....	32
III.2. Patogenicidad y enfermedad experimental .....	37
III.3. Vacunas .....	39
III.4. Fuentes y vías de la infección .....	41

	<u>pág</u>
IV. MATERIAL Y METODOS	
IV.1. Introducción .....	52
IV.2. Lugar de trabajo .....	54
IV.3. Materiales .....	55
IV.4. Métodos generales de aislamiento .....	57
IV.4.1. Primera etapa .....	57
IV.4.2. Segunda etapa .....	59
IV.4.3. Tercera etapa .....	61
IV.5. Medios de cultivo .....	64
IV.5.1. Medios de recogida .....	64
IV.5.2. Medios de enriquecimiento .....	66
IV.5.3. Soluciones de sustancias inhibidoras y tampones .....	70
IV.5.4. Medios de aislamiento .....	72
IV.5.5. Otros medios empleados .....	75
IV.6. Comprobación de la selectividad de los medios de cultivo .....	80
IV.7. Estudios de resistencia .....	82
IV.8. Métodos de clasificación e identificación .....	87
IV.8.1. Esquema general .....	87
IV.8.2. Medios y pruebas utilizados .....	90
IV.9. Estudio de la actividad hemolítica ..	101
IV.10. Pruebas serológicas .....	104
IV.11. Antibiógramas .....	105
IV.12. Inoculaciones experimentales en animales de laboratorio .....	118
IV.13. Técnicas de observación .....	123
IV.14. Métodos estadísticos .....	124
V. RESULTADOS	
V.1. Aislamientos .....	125
V.1.1. Primera etapa .....	125
V.1.2. Segunda etapa .....	135
V.1.3. Tercera etapa .....	140

### III

	<u>pág</u>
V.2. Pruebas con los medios de cultivo ....	153
V.2.1. Medios de recogida .....	153
V.2.2. Medios de enriquecimiento .....	154
V.2.3. Medios de aislamiento .....	159
V.3. Estudios de resistencia .....	172
V.3.1. Acriflavina CLH .....	172
V.3.2. Acido nalidixico y tripán azul .....	174
V.3.3. Azida de sodio y trifenil tetrazolio .....	176
V.3.4. Bilis al 40% .....	177
V.3.5. Cloruro sódico .....	177
V.3.6. Polimixina B .....	180
V.3.7. Telurito potásico .....	182
V.4. Determinaciones bioquímicas .....	188
V.5. Estudio de la actividad hemolítica ..	203
V.6. Serología .....	206
V.7. Antibiógramas .....	228
V.8. Inoculaciones experimentales en animales de laboratorio .....	244
V.9. Observaciones microscópicas y ultramicroscópicas .....	271

### VI. DISCUSION

VI.1. De las características de los cultivos en los diversos medios empleados ..	273
VI.2. De los agentes inhibidores .....	280
VI.2.1. Agentes físicos .....	280
VI.2.2. Agentes químicos .....	284
VI.3. De las pruebas bioquímicas y sus resultados .....	293
VI.4. De los estudios hemolíticos .....	297
VI.5. De las técnicas y resultados serológicos .....	301
VI.6. De la metodología y resultados de los antibiógramas .....	304



#### IV

	<u>pág</u>
VI.7. De las inoculaciones experimentales ...	308
VII. CONCLUSIONES .....	311
VIII. RESUMEN .....	318
IX. BIBLIOGRAFIA .....	322
X. MATERIAL FOTOGRAFICO .....	361

## I. INTRODUCCION

### I.1. OBJETIVO E INTERES DEL TRABAJO

La Listeriosis es una de las enfermedades bacterianas -- más recientemente descritas, tanto en sus aspectos epizootológicos y clínicos como bacteriológicos. Aunque ha transcurrido ya -- medio siglo desde que Murray y col. (214) describieran con detalle la bacteria que hoy conocemos como Listeria monocytogenes en/ este momento puede afirmarse que la etapa en que su aislamiento -- constituía una curiosidad de laboratorio ha pasado a ser historia y, en la actualidad, clínicos e investigadores, son conscientes -- de su transcendencia tanto en la patología humana como en la patología animal, y que esto es así vienen a demostrarlo la ubicuidad de sus aislamientos comprobada en más de 42 especies de mamíferos, 22 especies de aves, 30 especies de peces, anfibios, crustáceos e insectos.

Su distribución geográfica abarca sin excepción los cinco continentes, desde el Ártico al ecuador.

La enfermedad se describe habitualmente en hombre, animales domésticos, salvajes y de laboratorio al tiempo que se aíslan microorganismos del género de garrapatas y piojos, aguas residuales, lagos, vegetales, etc. según Gray y col. (133, 132) Botzler/ y col. (36), McCrum y col. (198), Kampelmacher y col. (174).

Sin embargo, y pese a esta amplia difusión, existen todavía aspectos no muy definidos de la epizootología y patogenia de las listeriosis y en el propio conocimiento del género Listeria -- quizá debido a una serie de factores, cuya enumeración y somero -- análisis pasamos a describir:

a) Las dificultades que plantea su aislamiento en muchos procesos subclínicos y crónicos, con el error de diagnóstico que/ ello implica (Robertson y col., 257).

b) La existencia de portadores fecales que no padecen la enfermedad al menos de forma sintomática (Gómez-Mampaso y col., 115, Kampelmacher y col., 174).

c) La dificultad de reproducir experimentalmente la infección con toda la constelación de síntomas y lesiones que de un modo natural se producen (Gray y col., 133).

En este sentido, no se comprende aún suficientemente, el papel que estos agentes puedan representar en síndromes tales como los trastornos mentales crónicos, desórdenes hepáticos crónicos, lesiones papulosas renales, etc., así como el mecanismo de la infección en los casos de encefalitis, meningitis y septicemia de los recién nacidos, además de su intervención patogénica en el aborto reiterado de las hembras de distintas especies, aunque la etiología de este último hecho esté perfectamente establecida según Ladds y col., (187), Sarrut y col., (269), Grangeponet y col., (121).

Por todos estos motivos y porque en nuestro país se carecía de datos estadísticos sobre reservorios naturales y portadores animales de estos microorganismos, se decidió en 1977/ comenzar en nuestro Departamento una línea de investigación sobre diferentes aspectos microbiológicos del género Listeria, -- fruto de la cual es el trabajo de Tesis Doctoral que presentamos.

## I.2. ANTECEDENTES HISTORICOS

En 1.891 y 1.893, Hayem y Henle en Francia y Alemania, -- respectivamente, observaron bacilos grampositivos en cortes de tejidos procedentes de pacientes muertos con lesiones y síntomas, -- que estudiados retrospectivamente, bien pudieran tratarse de listerias (citados por Gray y col., 133).

Hilphers (150) en 1.911 en Suecia aisló en focos necróticos de hígado de conejo un germen al que denominó Bacillus hepatitis, cuya descripción, así como la de las lesiones que originaba, encajan perfectamente con lo que hoy sabemos de Listeria monocytogenes; sin embargo y debido a que la cepa no se conservó, y a que existían ligeras diferencias entre este aislamiento y el realizado con posterioridad en 1.926 por Murray y col., (214) en Cambridge, -- a partir de hígado de conejos y cobayas enfermos, hace que se considere a estos últimos autores como los descubridores del primer microorganismo del género, al que denominaron Bacterium monocytogenes.

En el mismo plano de conjeturas debe de situarse también la descripción hecha por Atkinson (12) quien en 1.917 señaló un caso de meningitis producida por un bacilo grampositivo de tipo difterioide, que de igual modo pudiera tratarse de Listeria monocytogenes.

En 1.927, un año después de la descripción hecha por Murray y col, (214), Pirie (241) aisló una bacteria con las mismas características, del hígado de unos pequeños roedores africanos -- (*Iatera lobengulae*) a quien denominó Listerella hepatolytica.

Esta nueva enfermedad conocida como listeriosis se describe por Matthews en 1.928 (203) como la causa de un brote de encefalitis, de etiología desconocida acaecido en estas fechas.

Sin embargo Pletneva y col., (243) abogan que el primer aislamiento de L. monocytogenes se realizó en la Unión Soviética --

en 1.924 en el curso de una epidemia porcina, denominando al agente aislado "Bacillus X".

En cualquier caso, fuera quien fuese el primer descubridor del agente etiológico de la listeriosis, lo cierto es que desde la descripción de Murray y col., (214) en 1.926 y hasta el momento presente, se han venido sucediendo nuevas aportaciones sobre la enfermedad en el hombre y en distintas especies animales, entre las que caben destacar los trabajos de Nyfeldt en 1.929 (221), - - quien aisló el germen de la sangre de individuos enfermos de mononucleosis infecciosa; de Burn que en 1.933 (45) la aisló de niños/muertos, estableciendo su presencia como causa de infección en el periodo perinatal, y proponiéndola años más tarde (1.937) como causa de meningitis en individuos adultos; los de Gill en 1.933 (111), quien la describe como causa de la enfermedad que desde 1.929 se venía observando en ovejas que padecían una forma de encefalitis - que el mismo autor denominó "circling disease", calificación que - posteriormente fue aplicada a las encefalitis por Listeria en rumiantes. El mismo Gill (112), aisló el microorganismo dos años más tarde del cerebro de los animales afectados de esta enfermedad, - estableciendo así su etiología.

Graham y col., (119) son quienes proponen a este microorganismo como causa de abortos en el ganado bovino y Poppensiek - - (244) en 1.944 en el ganado ovino. Biester y col, (24, 25, 26) lo/aislan en una septicemia en aves, Paterson (233) en Inglaterra, -- Pallaske en Alemania, Schoop (271) en el alimento de los soldados/alemanes durante la guerra mundial, Cotoni (56a) en Francia, Wramby (326) en Suecia, etc.

Si compleja fue la discusión sobre la paternidad del descubridor de Listeria monocytogenes, no lo fueron menos los problemas suscitados sobre su taxonomía. Buena prueba de ello es la enorme cantidad de nomenclaturas propuestas para este microorganismo -

que en la séptima edición de Bergey's Manual de 1.957 se le clasifica como un género de la familia Corynebacteriaceae. En la octava edición de 1.974 se le encuadra dentro de los bacilos no esporulados como género de incierta filiación, e incluso Stuart y col., - (301) en 1.974 proponen la división del género en dos: Listeria y/ Murraya con la separación de L. denitrificans de estos dos nuevos/ géneros. A lo largo del tiempo, se la ha denominado Bacterium hepatis (Hülphers 1.911, 150), Bacterium monocytogenes (Pirie 1.927, 241), Listerella monocytogenes-hominis (Nyfeldt 1.932, 222), Corynebacterium parvulum (Schultz, 1.934, 272), Listerella ovis (Gill - 1.937, 112), Erysipelothrix monocytogenes (Wilson y col., 1.946, - 324) y Corynebacterium infantisepticum (Potel 1.950, 245). Otros - autores la han denominado con el nombre de procedencia de la cepa, y así se han empleado Listerella bovina, gallinarum, cuniculi, - suis y gerbilli.

Para poner fin a esta caótica situación, se comenzó por/ rechazar el nombre genérico de Bacterium propuesto por Murray en - 1.926 (214), por no tener nada en común con otros géneros hasta -- esa fecha ya descubiertos y que venían denominándose bacterium, co- mo ocurre con Bacterium multocida, hoy Pasterella multocida (Leh-- man y Neumann, 1.899). Lo mismo sucedió con el nombre genérico de/ Listerella, propuesto por Pirie en 1.927 (241), que fue rechazado/ por el Comité de nomenclatura del tercer Congreso Internacional de Microbiología de New York, en 1.939, por haberse aplicado por Jahn en 1.906 (161) a otro género para encuadrar ciertos mixomicetos. - Ante esta situación, Pirie propuso el nombre genérico de Listeria en 1.940 (242), que ya recoge la sexta Edición del Bergey's Manual y que fue aprobado por la Comisión Decisoria de Bacteriología, No- menclatura y Taxonomía, y que recoge el Boletín Internacional de - dicha comisión en 1.954.

El nombre específico de L. monocytogenes, propuesto por/

Murray en 1.926, debido a la monocitosis que provocaba en los animales infectados, fue asimismo aceptado por esta Comisión.

Las restantes especies del género fueron aisladas con posterioridad, y así Listeria denitrificans fue descubierta en 1.948/ por Sohler y col. (296), con motivo del hallazgo de un germen con propiedades similares a Listeria monocytogenes, pero que a diferencia de aquella, no era patógena. Prevot en 1.961 (246) en su trabajo de Sistemática Bacteriana denomina la especie como L. denitrificans por su propiedad de reducir los nitratos, aunque en la actualidad se está cuestionando su pertenencia a este género, debido a las grandes diferencias de composición, y a que no responde a los estudios de hibridación como las demás especies del género (Stuart y col., 301).

En 1.966 Errebo y col., (92) descubren una Listeria fermentadora del manitol, que denominaron Listeria grayi en honor a Gray, denominación específica, que es aceptada en el tercer Congreso Internacional de Listeriosis celebrado en Bilthoven. En 1.971 - se descubre por Welshimer y col., (321) una Listeria que fermenta el manitol y reduce los nitratos y que se denomina L.murrayi en honor al descubridor de la primera especie del género.

Finalmente en el último Congreso de Listeriosis celebrado en Madrid en 1.981, se propuso la inclusión de 2 especies nuevas que con toda seguridad serán aceptadas, Listeria bulgarica para la cepa aislada por Ivanov en Bulgaria en 1.957 (154), muy hemolítica, serotipo 5 y enzimáticamente poco activa, y Listeria innocua para las cepas de Listeria monocytogenes, no hemolíticas y no patógenas (Seeliger, 284).

## II. CARACTERISTICAS BACTERIOLOGICAS

### II.1. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA

#### II.1.1. Formas, agrupación y tinción.

Los microorganismos del género Listeria se presentan en forma de bacilos cortos, grampositivos, no ácido-alcohol resistentes y no esporulados.

Normalmente se les considera sin cápsula, aunque Smith/ y col., (294) después de cultivarlos en medios enriquecidos con suero y glucosa, y mediante estudios ultramicroscópicos e inmunológicos han revelado que poseen una cápsula mucopolisacárida, pese que hasta el momento no se reconozca en ninguna de las especies del género la existencia verdadera de la cápsula (43).

Las listerias presentan a veces un ligero granulado, -- aunque no poseen gránulos metacromáticos (Clavel y col., 50).

En ningún caso se observan en estos microorganismos -- agrupaciones características, y de esta manera pueden aparecer in distintamente como células aisladas, en parejas, como cadenas cortas de 3 a 8 elementos o largas cadenas, de más de 200  $\mu$ m., y en ocasiones formas empalizadas, en U o en Y, recordando a las corynebacterias, dependiendo del medio de cultivo y de la edad del -- mismo; en cultivos jóvenes suelen aparecer además, como cocobacilos de 0,2 - 0,5  $\mu$ m. por 1-2  $\mu$ m. de largo (Alés y col., 3).

Las bacterias del género Listeria, son fácilmente decolorables, apareciendo tanto en el caso de cultivos envejecidos como cuando se fuerza la decoloración en la clásica técnica de -- Gram, casi un 50% de bacterias como gramnegativas, proporción que se reduce cuando el cultivo se ha llevado a cabo en un medio rico en glucosa.

En tinciones de tejidos infectados o en los primeros -- cultivos en medio líquido pueden aparecer con forma cocácea, in--



cluso con apariencia de estreptococos (Gray y col., 133).

#### II.1.2. Estructura

Dentro de la célula, la membrana plasmática difiere/ del modelo clásico de unidad de membrana, 2 capas densas separadas por una clara, mientras que en las listerias aparecen 3/ capas densas, claramente definidas, de unos 15 a 35 Å de espesor separadas por 2 capas claras. La membrana plasmática se -- continúa con un sistema de membranas internas variables de tamaño y formando mesosomas, que pueden presentarse con cierta -- frecuencia como simples invaginaciones con forma de espiral o/ como complejas estructuras (Edwards y col., 85). El citoplasma presente también gránulos densos, de unos 100 Å de diámetro, y el aparato nuclear posee parecidas características al resto de las bacterias, con menos densidad que el citoplasma y apareciendo en forma de rosario o filamentos trenzados, de unos 25 a 50 Å de diámetro, según Edwards y col., (85), Grund (136), Kawata (176) y North (219).

#### II.1.3. Flagelos

Desde un principio y durante mucho tiempo se afirmó/ que las listerias eran móviles debido a la posición de un flagelo polar (45, 112, 150). Paterson observó cuatro flagelos peritricos y sugirió la posibilidad de que las listerias tuvieran cuatro flagelos peritricos cultivadas a 20 ó 22°C y uno polar/ a 37°C, circunstancia que se ha visto confirmada por los estudios realizados por Csontos (61), Leifson y col., (191) y -- Hartwick y col., (143). Así pues, Listeria monocytogenes, -- L. grayi y L. denitrificans poseen cuatro flagelos peritricos cultivadas a 22°C y un flagelo polar o ninguno a 37°C. Listeria murrayi, por su parte, posee cinco flagelos peritricos a -- 22°C y dos, cuatro o ninguno al cultivarlas a 37°C (15).

Leifson y col., (191) y Griffin y col., (134) descri

bieron la existencia de cepas flageladas no móviles a 37°C; -- sin embargo Seeliger (282) estableció que las cepas en cuestión eran móviles en ciertas condiciones y que producían antígeno H. Trabajos de microscopía electrónica, y posteriores estudios realizados por Fuhs y col., (106b) sobre producción de antígeno H, demostraron el desarrollo de cepas flageladas. Estos hechos parecen sugerir, que las listerias móviles pueden aparecer como inmóviles al cultivarlas en determinadas condiciones.

Una circunstancia semejante sucedió con el serotipo/cinco descrito por Ivanov en 1.957 (154) en el que todavía no se ha demostrado taxativamente la existencia de flagelos (Ivanov, 156).

Hartwick y col., (143) observaron unas pequeñas partículas situadas en el exterior de la pared bacteriana en cultivos examinados al microscopio electrónico y todavía no se ha determinado definitivamente el significado de estas partículas, virales con estructura de fago para Sword y col., (306) y de artefactos de cortes mal lavados para Gray (133)

## II.2. COMPOSICION QUIMICA Y PROPIEDADES BIOQUIMICAS

### II.2.1. Bioquímica estructural

Estudios bioquímicos sobre los porcentajes de Guanina + Citosina, Lípidos, Pared Celular y Citocromos (Collins y/col., 52) han revelado que existe una composición muy similar/ para las especies L. monocytogenes, L. bulgarica y L. innocua, parecidos para L. grayi y L. murrayi y ya bastante diferentes/ para la especie L. denitrificans.

Así los porcentajes de Guanina + Citosina en L. monocytogenes, L. innocua y L. bulgarica son de 36-38 moles por -- ciento; para L. grayi y L. murrayi de 36-40, y para L. denitrificans de 55-58. La pared celular contiene aproximadamente un/ 20% de hexosas (glucosa y galactosa), 5% de hexosamina y 5% de proteína, con alanina, ácido glutámico, ácido aspártico, leucina y ácido diaminopimélico, encontrándose este último en distinta proporción en la especie L. denitrificans (Collins, 52); no contiene ni glicina ni serina, diferenciándose en este aspecto de Erysipelothrix; aunque el estudio de composición de lípidos indica una cierta afinidad con el género Brochothrix, - (Collins, 52) y la familia Lactobacillaceae.

En comparación con otras bacterias grampositivas las listerias son más sensibles a los tratamientos con tripsina y/ nucleasas, hecho que permitió a Roots (266) obtener preparados homogéneos de pared celular después de una extracción inicial/ mediante agitación (durante 4 horas con perlas de vidrio) y un posterior tratamiento enzimático con tripsina, ribonucleasa y/ desoxirribonucleasa.

En este sentido y en base a estudios bioquímicos y - de hibridación intergenéricos y dada la evidente aunque no concluyente relación entre Listeria, Erysipelothrix, lactobacilos

estreptococos y Brochothrix thermosphacta, Stuart y col., en -- 1.974 (301) proponen la creación de una nueva familia Listeria-ceae con 2 géneros, Listeria con una sola especie L. monocytogenes y Murraya con una especie M. grayi y una subespecie M. grayi subespecie murraya quedando L. denitrificans separada de la nueva familia.

Los cultivos jóvenes de L. monocytogenes obtenidos de material patológico son capaces de lisar los hematíes de la mayoría de los mamíferos (Seeliger, 179), mientras que algunos -- cultivos viejos no presentan esta propiedad (Gray y col., 133).

Algunas cepas poseen una pronunciada actividad beta--hemolítica en sangre de carnero, con amplias zonas de hemólisis. Sin embargo, son los hematíes de caballo los que con más regularidad son lisados por las distintas estirpes (Seeliger, 284). -- La producción de hemolisina no sufre modificación si el cultivo se incubaba en atmósfera de O<sub>2</sub> o de CO<sub>2</sub> a 37 ó 20°C, sin embargo/ se ve netamente reducida en cultivos a 4°C (Kleikamp, 185).

Girard y col., (113) observaron que la naturaleza de/ la hemolisina, que era soluble y filtrable, correspondía a una/ globuloproteína, e incluso elaboraron un método diagnóstico valorando la antihemolisina en el suero, similar al método que se estaba utilizando para valorar la antiestreptolisina; sin embargo, pronto dejó de usarse, pues según observaron Njoku-Obi y -- col. (217) existían factores antihemolíticos en el suero normal de la mayoría de las especies.

Jenkins y col., (165) purificaron la hemolisina precipitándola con sulfato amónico y posterior absorción en geles de fosfato cálcico. La cisteína y el sulfito sódico, así como -- otro número reducido de sustancias incrementan la actividad de/ la hemolisina. Rogul y col., (263) establecieron que se trataba de una hemolisina oxígeno lábil.

Las especies L. murrayi, L. grayi y L. denitrificans --

así como los serotipos 4f, 4g y 6 de L. monocytogenes, no parecen poseer actividad hemolítica alguna. Este es otro de los motivos - por el que a estos serotipos se les pretende encuadrar en la especie L. innocua, aunque Nicheva y col., (215) en un estudio realizado sobre la actividad hemolítica de 63 cepas de L. innocua encontraron que al 100% de las cepas encuestadas lisaban los hematies de carnero.

También la especie L. monocytogenes tiene localizado en la pared celular un agente denominado MPA (agente productor de monocitosis), que fue extraído por Stanley en 1.949 (300) con solventes orgánicos.

Una vez aislado y purificado por este método, es serológicamente inactivo y tiene baja toxicidad tisular. La inyección intravenosa al ratón de un extracto de pared celular obtenido por desintegración sónica y posterior centrifugación desarrolla monocitosis en el 24% de los animales inyectados. También se ha aislado un componente tóxico del extracto acuoso de L. monocytogenes al precipitarlo con alcohol etílico (Srivastava y col., 1.974, citado por Seeliger, 284). Este compuesto es pirogénico para el conejo, produce edema y exantema en la piel del mismo y es letal para el embrión de pollo, siendo también inmunogénico para el ratón después de grandes dosis repetitivas.

#### II.2.2. Enzimas respiratorias

Desde muy antiguo, todos los autores vienen manifestándose en el sentido de la presencia de una catalasa en los microorganismos del género Listeria, Seeliger (278) y Bergey's Manual -- (43) entre otros. Sin embargo, Jones en 1.974 (166) observó que la actividad de esta catalasa disminuía o desaparecía totalmente/ tras el crecimiento en medios enriquecidos con extracto de levadura al 0,25%, también Friedman y col., en 1.962 (104) observaron la depresión en la actividad de la catalasa tras el crecimiento en medios enriquecidos con glucosa al 1%, detalle no observado --

por Jones (116), y que sin embargo nosotros si apreciamos en - 1.978 (302).

Estudios electroforéticos realizados por Robinson en 1.968 (260) demostraron la presencia de una sola banda para la catalasa con una movilidad parecida a la del Corynebacterium - diphtheriae, y que contiene un grupo hemo, pues es inhibida -- por el cianuro potásico.

Los estudios sobre la presencia de cadenas de cito-- cromos también han tenido sus contradicciones, así mientras -- Keeler y col., en 1.960 (177) fueron incapaces de demostrar la presencia de citocromos, la cuantificación del hierro presente en fragmentos de pared celular, que contenían restos de membra-- nas celulares les hicieron pensar en la presencia de citocro-- mos. Trivett y col. en 1.971(311) estudiando espectrofotomé-- tricamente extractos celulares y suspensiones de pared de L. - monocytogenes llegaron a la conclusión de que no existían res-- tos de citocromos en los mismos, no obstante, Jones (166) afir-- ma que cultivos negativos a la prueba de la benzidina, se posi-- tivizan al suplementar con hierro el medio de cultivo.

### II.2.3. Metabolismo glucídico

Es necesario la presencia de hidratos de carbono en/ los medios de cultivo para un desarrollo óptimo de las distin-- tr cepas de Listeria. El catabolismo de la glucosa tanto en - condiciones aeróbicas como anaeróbicas es fundamentalmente ho-- mofermentativo según Miller y col. en 1.959 (209). Los estu-- dios realizados por Friedman y col. en 1.962 (104), sin embar-- go, indican la producción de pequeñas cantidades de la lactato y piruvato cuando se incorpora glucosa al medio en cantidad m<sup>i</sup>nima (0,2%).

Un estudio pormenorizado de los enzimas del ciclo -- del ácido cítrico realizado por Trivett y col. (311) reveló/ que no existía mas que una porción de los enzimas del ciclo, -

tanto en la parte oxidativa como reductora, sugiriendo los --  
autores que estas enzimas son importantes para la biosíntesis  
celular y no para la obtención de energía, que se obtendría -  
con toda seguridad mediante glucólisis.

### II.3. CULTIVO Y AISLAMIENTO

Los microorganismos del género Listeria no son muy exigentes en su cultivo, creciendo bien en medios ordinarios desde -4 a 40°C y desde pH 6 a 9 según Kampelmacher y col. (172), García y col. (109), Robin y col. (259). Soportan mal los pH ácidos, y el tiempo de supervivencia en los medios de fermentación de azúcares es corto. Son aerobios o microaérofílos, creciendo hasta en atmósferas con el 10% de CO<sub>2</sub>; la adición de sangre y glucosa a los medios de cultivo favorece su crecimiento. Necesitan para desarrollarse la presencia de Biotina, Tiamina, Riboflavina, Cisteína, Glutamina, Isoleucina y Valina; la presencia de Arginina, Histidina, Metionina y Triptófano, sin ser indispensable, favorecen el crecimiento según Gray (133).

Por las razones expuestas, el aislamiento de las bacterias de este género a partir de bajos niveles de contaminación, es relativamente fácil sobre un agar triptosa (mejor que con peptona) con 1% de glucosa y 5% de sangre. El problema se plantea, sin embargo, cuando el aislamiento se ha de realizar de un material fuertemente contaminado como es el caso de heces, fluidos vaginales, efluentes, ensilados, etc., en los que la proporción de listerias es relativamente baja con respecto a la flora acompañante. En estos casos se requiere un enriquecimiento previo de la muestra en condiciones en que las listerias puedan prosperar y no el resto de flora microbiana acompañante, o al menos en condiciones en que la fase exponencial de crecimiento sea netamente favorable para las listerias. De esta manera, aprovechando las diversas propiedades metabólicas, así como la aptitud de estos microorganismos para crecer en diferentes condiciones ambientales, pueden formularse distintos métodos de enriquecimiento.

Uno de los primeros descritos y que supuso un enorme - -



avance en el aislamiento de estos agentes, fue el enriquecimiento a 4°C en caldo nutritivo, previa maceración de la muestra por -- tiempo variable (hasta un año), propuesto por Gray y col. en 1948 (123, 125, 128) y refrendada por Kampelmacher y col. (169), Osebold y col. (228), Seeliger y col. (283) y Smith y col. (293) entre otros. Ha sido, a la postre, el método más utilizado y el -- que ha servido para contrastar las demás técnicas, aunque tiene -- el inconveniente de ser un proceso largo y complicado.

Zink y col. (328) recomiendan el mismo sistema, pero sus pendiendo la muestra en caldo tioglicolato. Sobre la misma base, Kemenes (178) utiliza un caldo de extracto de carne de caballo -- con un 0,3% de tioglicolato sódico y 10% de sangre de carnero; -- otros medios con tioglicolato han sido propuestos y utilizados -- también por Kampelmacher 1.969, (171), Ralovich 1.970, (248), Ortel 1.971, (226) y Elischerova 1.972, (86).

Simon (289) recomienda el caldo de cerebro-corazón, dex troso y extracto de placenta y, más recientemente, Rappaport (255) utiliza un medio compuesto por triptosa, extracto de carne, gluco sa, cloruro sódico y vit. B<sub>1</sub>. Todas estas técnicas de enriqueci-- miento, modificaciones de la de Gray, rinden buenos resultados -- aunque cierto es reconocer, que con el mismo inconveniente, repre-- sentado por un tiempo largo de enriquecimiento a 4°C.

Pease en 1.967 (239) recomienda el enriquecimiento de -- las muestras tras la inoculación por vía subcutánea en ratones; -- en 1.981 Kemenes y col. (179) utilizan el mismo sistema, solo -- que los ratones se inmunodeprimen previamente tras la inoculación de cortisona y Bacillus piliformis. Una y otra no dejan de ser -- técnicas demasiado complicadas por el gran número de animales que hay que manejar, y como quedó expuesto en el Congreso Internacional de Listeriosis de Madrid, por la legislación restrictiva de -- algunos países para la utilización de animales de experimentación indiscriminadamente.

En cuanto a los medios selectivos de aislamiento, se han probado también numerosas sustancias químicas inhibidoras de la flora acompañante, con resultados diversos. Una de las primeras utilizadas fue el telurito potásico, empleado por Gray y col. en 1.950 (124) a una concentración final del 0,05%. Esta técnica solamente es válida cuando la flora contaminante está compuesta por especies sensibles al telurito; ahora bien, cuando se pretende aislar listerias de una materia tan fuertemente contaminada como son las heces, este método presenta tres grandes inconvenientes:

1) La concentración del 0,05% de telurio potásico no inhibe el crecimiento de estreptococos fecales y estafilococos.

2) Esta concentración inhibe el crecimiento de algunas cepas de listerias según Olson y col. (224).

3) Los microorganismos del género Listeria reducen el telurito, apareciendo las colonias de un color negro y con una morfología similar a la de estreptococos y estafilococos, que también son reductores del telurito, según Mellado 1.977 (206). Por esta razón, el interés de este método ha quedado relegado a una prueba bioquímica más, a la hora de identificar listerias, según Ralovich y Khan, (citados por Ralovich, 252).

Kampelmacher y col. en 1.961 (169), intentan incrementar la selectividad del medio añadiéndole 0,2 mg de cloranfenicol por 100 ml del medio de cultivo, aunque en la práctica, estas modificaciones continúan presentando el mismo inconveniente de inhibir o empobrecer el crecimiento de algunas cepas según Seeliger 1.958 (278), y de diferenciación entre listerias, estreptococos y estafilococos (Mellado, 206). La polimixina B, como sustancia inhibidora propuesta por Bojsen-Moller en 1.962 (34) y ratificada por Ortel 1.971, (citado por Ralovich, 252), inhibe notablemente el crecimiento de gérmenes gramnegativos, pero presenta el inconveniente de que, al menos en parte, impide el desarrollo

llo de las listerias y que los cocos positivos crecen junto a -- ellas.

El medio selectivo desarrollado por Mc Bride y Girard - (197), basado en los resultados obtenidos por Shimizu y col. - - (287) tras la incorporación de guanofuracina a la concentración 1:10.000, preparan un primer medio de enriquecimiento de caldo - triptosa fosfato con nitrofurazona al 1:100.000, y un medio de -- aislamiento confeccionado a partir de agar base con fenil etanol con la adición de cloruro de litio al 0,05%, 1% de glicina y 5% de sangre. Este medio también utilizado por Donker-Voet en 1972, citado por Ralovich 1.974 (252), adolece al igual que los anteriormente descritos, de una selectividad estricta para los microorganismos del género Listeria.

El uso de azida de sodio recomendada por Gray en 1.950/ (124) plantea los mismos problemas de especificidad que el telurito potásico, ya que a la concentración que se emplea (0,01%) pueden desarrollarse los estreptococos fecales, si bien tiene la -- ventaja de no producir colonias negras.

Un agente selectivo muy eficaz, el ácido nalidixico, -- utilizado por Beerens y Tahon Castel en 1.966 (19), inhibe el -- crecimiento de las bacterias gramnegativas a la concentración de 0,04 gr por litro de cultivo, e inhibe el crecimiento de microorganismos del género Proteus y otras enterobacteriáceas. Practicando los cultivos en medios muy aireados, se consiguen eliminar los anaerobios, quedando reducido el espectro de crecimiento a -- unos pocos géneros, entre los cuales es fácil diferenciar morfológicamente las listerias.

En 1.961 Fuzi (107) prepara un medio con tiocianato potásico como inhibidor, empleado también por Lehnert en 1.964, - - (190), aunque Ralovich en 1.972, (250), ya lo señala como medio/ poco recomendable para el aislamiento de muestras muy contaminadas.

En 1.957 Pancheco y col. (232) comprueban la sensibilidad de Listeria frente a distintos colorantes demostrándose como buenos agentes selectivos el sudán III, la fucsina básica y el cristal violeta.

A partir de la incorporación del ácido nalidíxico por Beerens y col. (19) a los medios, y comprobada su eficacia, se intenta complementar su acción selectiva con la adición de diversas sustancias. Así Krammer y Jones en 1.969 (186) añaden acetato de talio, Despierres en 1.971, (71) añade polimixina B y, en 1.970, Ralovich y col. (248) le añaden tripaflavina en base a los resultados obtenidos por Forray en 1.969 (citado por Ralovich, 250) y Klimmer, Hanpt y Borchers en 1.930 (citados por Ralovich, 252) que comprobaron su efecto inhibidor sobre gérmenes grampositivos. La eficacia de la asociación de estas dos sustancias ha sido reiteradamente contrastada (Seeliger, Ortel, - - - Kampelmacher, Elischerova, Manev, Bockemuhl, Hohne, etc.). Existen trabajos incluso sobre la efectividad de las tripaflavinas de distinta procedencia (Ralovich, 249), pero de lo que no cabe duda es que es uno de los inhibidores con más amplia aceptación.

## II.4. ESTRUCTURA ANTIGENICA E IDENTIFICACION SEROLOGICA

### II.4.1. Grupos serológicos

Los estudios serológicos con microorganismos del género Listeria se iniciaron con Seastone en 1.935 (citado por Gray y col., 133) en diversas cepas de L. monocytogenes. En pruebas -- realizadas mediante aglutinación y adsorción de aglutininas se encontró una cierta relación entre las cepas de listerias de origen humano y animal, con la excepción de la cepa aislada por -- Murray y col. en 1.926.

Similares resultados obtuvieron Carey en 1.936 (48), -- Webb y col. 1.937 (315), Schultz y col. 1.938 (273), y Juliane--lle y col. en 1.939 (167), todo lo cual permitió la división de las listerias en dos grupos serológicos, dependiendo del origen/ de las cepas: las procedentes de roedores y las procedentes de -- rumiantes. La cepas de origen humano se fueron encuadrando in--distintamente en uno u otro de estos serogrupos.

El conocimiento serológico se vio notablemente aumentado al aplicar Paterson en 1.939 (233) el análisis de antígenos -- somáticos y flagelares, usando las técnicas empleadas por White/ y Kauffman en el género Salmonella; con este modelo dividió al -- género en 4 serotipos distintos.

Esta clasificación, por supuesto, no depende en ninguna -- forma de la especie del portador, y no aparece ninguna relación/ entre serotipo bacteriológico y especie hospedadora, ni existe -- una distribución geográfica especial de los disntintos seroti--pos. La diferencia se hace en base a que los serotipos 1, 3 y 4 tienen diferencias en los antígenos somáticos y el 2 contiene un antígeno flagelar distinto.

Este esquema antigénico fue confirmado repetidamente -- por diversos autores y se mantuvo estable durante mucho tiempo, /

hasta que se fueron descubriendo nuevos antígenos, y así Seeliger en 1.958 (278) divide el serotipo 4 original, en dos subgrupos a los que denominaron 4a y 4b atendiendo a diferencias en los antígenos somáticos.

Donker Voet en 1.959 (77) añade los serogrupos 4b, 4c y 4d también en base a diferencias en antígenos somáticos, y además añade los serogrupos 1a y 3a, por encontrar diferencias en los antígenos flagelares. El serotipo 5 lo describe Ivanov en 1.957 (154) y es caracterizado posteriormente por otros autores/ (Ivanov 1.962, 155, Cooper y col. 1.978, 53). Los serotipos 3c, 6, 7 y Listeria murrayi los describen Donker-Voet en 1.966(78) y Stuart y col. en 1.974 (301) respectivamente.

Reuniendo cuanto antecede pues, la situación de los distintos serotipos, podemos apreciarla en el cuadro nº 1.

#### II.4.2. Distribución geográfica

En cuanto a la distribución geográfica de los distintos grupos serológicos, según Seeliger (284), el 98% de las cepas aisladas de material patológico a partir del año 1.951 son los serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4b y 5, estando distribuidos aleatoriamente por todo el mundo.

Como prueba de ello en USA y Canadá el serotipo 4b supone del 65 al 85% de los aislamientos (King y col., 183) mientras que en Europa del este, centro de Alemania, oeste de Africa, - Finlandia y Suecia corresponden los aislamientos más frecuentes/ al serotipo 1/2a, y en el oeste de Europa particularmente Francia según Seeliger y col. 1.955 (277), Lucas y col. 1.957 (195), Hühne y col. 1.975 (149), Kampelmacher y col. 1.966 (168), son los serotipos 1/2a y 4b los aislados en mayor proporción, al igual que en Suecia (Larsson, 189). En el oeste de Alemania el serotipo 1/2a es el que prevalece hasta 1.958, siendo a partir -

CUADRO Nº1: SEROTIPOS DE L.monocytogenes Y ESPECIES RELACIONADAS (L.grayi-L.murrayi)

Paterson	Seeliger Donker-Voet	Antígenos O		Antígenos H	
1	1/2a	I	II (III)	A B	
	1/2b	I	II (III)	A B C	
2	1/2c	I	II (III)	B D	
3	3a	II	(III) IV	A B	
	3b	II	(III) IV	A B C	
	3c	II	(III) IV	B D	
4	4a	(III)	V VII IX	A B C	
	4ab	(III)	V VI VII IX	A B C	
	4b	(III)	V VI	A B C	
	4c	(III)	V VII	A B C	
	4d	(III)	V VI "VIII"	A B C	
	4e	(III)	V VI ("VIII") (IX)	A B C	
Listeria sp +	4f Complejo	(III)	V	XV A B C	
	4g	(III)	V VI VII	X XI A B C	
	5	(III)	V VI "VIII"	X A B C	
Listeria +	6 (sub judice)	(III)	V VII "VIII"	XI A B C	
	7	(III)		XII XIII A B C	
M.grayi (ssp.grayi)		(III)		XII XIV E	
(ssp.murrayi)		(III)		XII XIV E	

"VIII" Sujeto a investigación  
+ Cepas no hemolíticas, probablemente representan especies o subespecies diferentes de L.monocytogenes para las que se ha propuesto el nombre de L.innocua. (Seeliger y Hühne, Methods in Microbiology, 284).

de esta fecha en cambio, el 4b el que ha dominado en la mayoría de las epidemias (Seeliger y col., 284).

También se ha venido produciendo con bastante asiduidad el aislamiento de varios serotipos de Listeria de un mismo/paciente, o el aislamiento de serotipos distintos en la madre y el feto abortado por listeriosis. Este fenómeno, según Seeliger, parece obedecer a infecciones mixtas más que a inestabilidad serológica de los microorganismos (Seeliger, 284).

#### II.4.3. Reacciones cruzadas

Se han observado reacciones serológicas cruzadas entre distintos serotipos de listerias y otras bacterias. Seeliger apreció que los sueros obtenidos con serotipos 4a y 4b de Listeria monocytogenes presentaban anticuerpos que aglutinaban algunas cepas de estreptococos fecales; sin embargo, esta circunstancia no se produce con otros serotipos. También se han observado reacciones cruzadas entre Listeria monocytogenes y algunas cepas de E. coli, según Jaeger y col., 1.954 (citados por Seeliger, 184) y Staphylococcus aureus (Seeliger 1.961, 278), -- así como entre listerias y algunas corynebacteriáceas móviles.

Existe una interrelación muy directa entre las hemolisinias producidas por listerias y las de los estreptococos beta--hemolíticos, lo cual parece ser una de las causas de estas -- reacciones cruzadas que aparecen entre los 2 géneros (Seeliger/ 1.979, 284).

Para resumir, podemos decir que las reacciones cruzadas que se presentan entre microorganismos del género Listeria/ y gran número de gérmenes grampositivos se deben a la presencia de antígenos inespecíficos presentes en estos gérmenes, según Seeliger 1.961 (278).

#### II.4.4. Diagnóstico serológico

A tenor de lo anteriormente expuesto sobre reacciones



serológicas cruzadas entre microorganismos del género Listeria y otras bacterias grampositivas y negativas, el valor diagnóstico de las distintas pruebas serológicas queda un poco en entredicho, como queda reflejado en la amplia bibliografía al -- respecto, Seeliger 1.961 (278), Morel y col., 1.978 (213), Romanía 1.979 (265), Rigal y col., 1.979 (256).

Se han empleado todas las técnicas clásicas de serología con resultados prácticamente análogos: aglutinación, fijación de complemento, precipitación, inmunofluorescencia, inmunoelectroforesis, etc., de ahí que, a todas las pruebas serológicas se las considere de gran valor a la hora de complementar los resultados culturales y bioquímicos de los aislamientos positivos de Listeria, pero de escaso y discutible valor a la hora de establecer un diagnóstico positivo de la enfermedad, ya que con frecuencia pueden aparecer, tanto casos auténticos de la listeriosis serológicamente negativos, como títulos altos de anticuerpos séricos repetitivamente, durante largo tiempo, incluso dos años (Morel y col., 1.978, 213) sin evidencia sintomática ni bacteriológica de la infección.

## II.5. LISOTIPIA

Uno de los primeros autores en describir la presencia - de un fago en cultivos de listerias fue Schultz (274) en 1.945. A partir de esa fecha muchos han sido los investigadores y numerosas las técnicas, que se han empleado para atemperar los fagos de Listeria monocytogenes (Sword y col., 306), Guillot y col., - 137 y Jasinska, 163).

Sword y col (306) consiguieron aislar 18 fagos de 121 - cultivos induciendo la maduración de los provirus mediante radiación ultravioleta de 2.537 Å de longitud de onda durante 60 segundos, estableciendo una clasificación por fagotipado similar a la serológica de Paterson.

Con posterioridad han continuado aislándose fagos de cepas lisogénicas de Listeria monocytogenes en un intento de establecer patrones internacionales para el fagotipado de estos microorganismos. En este sentido Watson y col. (314) en 1.965 aislaron un fago que lisaba el 100% de las Listerias monocytogenes/ por ellos probadas, de los serotipos 1, 2 y 4 y el 50% del serotipo 3.

Ortel (227) con un grupo de 15 listeriofagos aislados - por él mismo, consigue tipar el 30% de las cepas probadas de los serotipos 1/2a y 4b entre los años 1.957 y 1.979. Ralovich y -- col., en 1.981 (253) con una serie de 27 fagos, consigue tipar - un 45% de cepas de distintos orígenes, siendo más fácilmente tipables las del serotipo 6. Por fin Rocourt y col. en 1.981 - - (261) con un conjunto compuesto por 3 fagos aislados de cepas - lisogénicas espontáneas de L. monocytogenes, serotipo 5; 3 de -- Listeria innocua serotipos 6a y 6b y 12 fagos atemperados aislados de serotipos 1/2a y 4b de L. monocytogenes, consiguen tipificar el 76% de las cepas probadas, alcanzando el porcentaje de/ 92,3% para el serotipo 5; no obstante, todavía se continúa avan-

zando en esta línea para conseguir un modelo de fagos frente a -  
Listeria de ambito internacional y que permita determinar el fa-  
gotipo de un número significativo de estirpes, con el fin de - -  
complementar y ayudar a la clasificación de las distintas cepas/  
de la especie L. monocytogenes, e intentar el fagotipado del res  
to de las especies del género.

## II.6. PRUEBA DE CAMP

Una de las características de los microorganismos del género Listeria que más trascendencia tiene a la hora de considerar la patogenicidad de las distintas cepas es su capacidad para producir beta-hemólisis.

Hasta tal punto es importante este aspecto, que se ha propuesto separar en una nueva especie las cepas no hemolíticas/ de los serotipos 4 y 6 (Seeliger y col., 284), aunque esta característica a veces no esté ligada biunívocamente a la patogenicidad, ya que se ha comprobado que algunas cepas no hemolíticas -- tienen cierto poder invasivo (Patocka y col. 235, Audurier y -- col., 14), y que la capacidad hemolítica se pierde tras el cultivo en medios artificiales, volviéndola a recuperar tras inoculaciones sucesivas en ratón (Gray y col., 133).

Se ha observado también la transferencia del carácter hemolítico desde cepas que lo son a otras no hemolíticas según Cormier (55), al mismo tiempo que su capacidad patogénica. La pérdida de la capacidad hemolítica tras la incubación con ciertas sustancias como el estradiol (Harrison y col., 142), es un hecho probado.

A la vista de la trascendencia que tiene la determinación precisa de la capacidad hemolítica de las distintas cepas de Listeria, Brzin y col. en 1.974 (42) observaron que en Listeria se producía el fenómeno de CAMP, al igual que en Streptococcus agalactiae, y pusieron en uso una técnica similar, para determinar con toda fiabilidad la presencia de hemolisinas.

Para ello, sobre un medio nutritivo con hematíes lavados de carnero, se siembra una estría de un Staphylococcus aureus que produzca una amplia zona de beta-hemólisis, y perpendicularmente a él, en estrías, las cepas problema, produciéndose un incremento de la hemólisis en la proximidad de la cepa de/

**Staphylococcus.**

Mediante este método, cepas que en medios ordinarios se manifiestan como no hemolíticas, son capaces de producir una zona de hemólisis. La explicación de este fenómeno aún no está -- clara, al igual que sucede con Streptococcus agalactiae. Algunos autores sugieren que este hecho es debido a la presencia de/ un factor extracelular, filtrable y termoestable (Seeliger y -- col., 284).

## II.7. FORMAS DEGENERATIVAS

### II.7.1. Formas L.

Los microorganismos del género Listeria, como algunas - otras bacterias, presentan la característica de formar, en - - ciertas condiciones, variantes desprovistas de pared celular, -- bien de manera espontánea o inducida y estables o no (Gray y - - col., 133).

La producción de estas variantes L. ya fué sugerida por Smithy y col. (cit. por Gray, 133) al tener evidencia de unas -- formas de L. monocytogenes filtrables. Su obtención mediante in ducción fue conseguida por Suchanova y col. en 1.957 (304), cul tivando listerias en un medio que contenía penicilina o glicina. El crecimiento en presencia de penicilina produce unas colonias/ enanas, de cocos muy pequeños. La glicina produce unas formas filamentosas o formas redondeadas de gran tamaño.

También es posible observar estas formas desprovistas - de pared y con localización intracelular, tras la inyección de - Listeria monocytogenes por vía intramuscular en el conejo con el coadyuvante de Freund. La reversibilidad de este carácter inducido, según Suchanova y col. (304), se consigue normalmente tras varios subcultivos en medios desprovistos de los factores que in dujeran este estado.

Numerosos autores (Gray 128, Hahnefeld y col., 138, Miller y col., 210, Payne 238, Schultz 275, Suchanova y col., 305) sugirieron la idea de que estas formas son las responsables del/ fácil acceso que tienen algunos microorganismos del género para/ , atravesar la barrera placentaria, y la dificultad que supone a - veces su aislamiento en medios de cultivo artificiales; tratando algunos autores de reproducir experimentalmente la enfermedad -- con estas variantes bacterianas con resultados normalmente negativos.

## II.8. HABITAT Y RESISTENCIA

Como ya ha quedado expuesto en el presente capítulo, -- los microorganismos de este género tienen una gran difusión en la naturaleza (Welshimer, 321, Kampelmacher y col., 173, Weis, 319), debido a su gran resistencia y a las condiciones ambientales, a pesar de no desarrollar ningún órgano o estructura específicos de resistencia (cápsulas, esporos, etc.) (43).

Habitualmente se les aísla de las heces del hombre y -- los animales sanos, aguas de lagos, ríos, efluentes y aguas residuales, ensilados y vegetales en descomposición, suelo, abonos y fertilizantes. También se aíslan de órganos y lesiones del hombre y animales, tanto homeotermos como poiquilotermos. Se han encontrado en cerebro, sangre, líquido cefalorraquídeo, fluidos vaginales, meconio, hígado, glándulas antirrenales, bazo, abscesos y empiemas localizados (Robertson y col., 258, Gouet, 118, Gómez-Mampaso y col., 114).

Estudios realizados recientemente por Zachar y col. en/ 1.979 (327) demuestran una gran capacidad por parte de estos microorganismos para colonizar el tracto intestinal de ratones libres de gérmenes, mostrando una gran capacidad patógena. Cuando las cepas suministradas estaban en fase lisa ocasionaban hasta el 28% de muertes en los animales inoculados, mientras que tal índice de mortalidad era muy bajo cuando estaban en fase rugosa/ (4% de muertes), habiéndose encontrado en todos estos casos una reversión de la forma rugosa a lisa. El mismo experimento repetido en ratones con una colonización normal del intestino no producía ningún efecto letal en los mismos.

La resistencia a las condiciones adversas y la capacidad de supervivencia de estos microorganismos es extraordinaria, lo cual explicaría en parte su gran difusión; así se las puede aislar con regularidad en heces, ensilados, tejido nervioso y --

leche tras doce años de la inoculación primaria (Dijkstra, 75). - También su capacidad de resistencia térmica es muy elevada soportando temperaturas de 61,7°C durante 35 minutos en agua y leche, con una reducción de 3 ciclos logarítmicos solamente (Bearn y - col., 18).



### III. EPIDEMIOLOGIA

#### III.1. BIOLOGIA DE LA INFECCION

Los mecanismos desarrollados durante la infección natural y experimental contra la enfermedad y la reinfección, no son aún perfectamente conocidos, aunque se haya avanzado considerablemente en este campo.

Los parásitos intracelulares facultativos, como es el caso de la Listeria, no son destruidos por los macrófagos normales como sucede en el caso de los agentes infecciosos que se comportan como parásitos extracelulares obligatorios, sino que por el contrario pueden multiplicarse en el interior de las células. En estos casos la resistencia del hospedador, se llama resistencia celular adquirida.

Como un hecho constatado ya por muchísimos autores (Van der Meer y col., 205, Hasenclever y col., 144, Jenkin y col., -- 164, Miki y col., 209 y Osebold y col., 230, entre otros) se ha observado que la infección por un parásito intracelular, provoca en el hospedador una resistencia a la enfermedad, que no se adquiere sin embargo en el caso de inyectar microorganismos muertos (Van Dijk y col., 74, Hobson, 146 y Holland, 148).

Esta resistencia celular adquirida no es transmisible -- mediante la inoculación de sueros inmunes, aunque sí puede ser -- transmitida mediante macrófagos procedentes de un hospedador resistente (Dustoor y col., 83), macrófagos que son capaces de fagocitar e impedir la multiplicación de los gérmenes (Fauve y -- col., 96, Osebold y col., 220).

Una circunstancia a tener en cuenta en este tipo de resistencias es su falta de especificidad, y así los animales con inmunidad a Listeria presentan también un cierto grado de resistencia celular a la infección por otros parásitos intracelulares

antigénicamente distintos en las pruebas serológicas (Sato y -- col., 270) habiéndose puesto de manifiesto que los macrófagos de ratón infectados con Listeria monocytogenes, son también bacteri~~i~~cidas para Salmonella typhimurium, sin que exista ningún anti- -- cuerpo antisalmonella detectable en el suero (Blanden y col., -- 28).

A pesar de esta aparente inespecificidad, la resisten-- cia del hospedador a Listeria, se parece mucho a las reacciones/ inmunológicas; esta afirmación viene avalada por el hecho de que independientemente de la dosis infectante de gérmenes, la activi~~d~~dad antimicrobiana no se puede detectar en el hospedador o en -- sus macrófagos durante un cierto tiempo, que es el que correspon~~d~~de al periodo de desarrollo de la respuesta inmunológica.

Los animales ya inmunizados pierden gradualmente su resistencia adquirida, que sin embargo, se exalta enormemente tras una nueva inyección de listerias vivas o muertas (Mackaness y -- col., 199).

Diferentes experiencias demuestran claramente que son -- los linfocitos sensibilizados quienes protegen al hospedador con~~tra~~ las listerias por medios indirectos. Así, la incubación de/ bacterias con linfocitos esplénicos inmunes, no atenúa su efecto patógeno, como lo revela la inyección ulterior de estos gérmenes en el ratón; también los linfocitos de donadores inmunizados con BCG son incapaces de proteger a receptores normales contra la in~~fección~~fección listeriana, aunque los donadores tengan un importante -- grado de resistencia a contraer la enfermedad.

Los linfocitos inmunes no transfieren la resistencia a/ la infección a receptores irradiados en los que los macrófagos -- normales tienen una vida corta y sus precursores en la médula -- ósea por estar en división son notablemente radiosensibles.

Los macrófagos de cobayas, que tienen una hipersensibi- lidad retardada a un antígeno proteico, están dotados de una ca-

pacidad bactericida aumentada para Listeria cuando el conjunto - de células del exudado peritoneal se cultivaron con el antígeno/ proteico antes de la infección in vitro (Simon y col., 290).

Todas estas experiencias indican que las células linfoides no tienen el equipo necesario para asegurar por sí solas la resistencia celular adquirida, que no se verifica sin la presencia de macrófagos (Touraine y col., 308).

La transferencia de macrófagos inmunes al receptor confiere una inmunidad local que se manifiesta solamente cuando las listerias han estado en contacto directo con los macrófagos (Miki y col., 209). Al contrario, cuando se inoculan linfocitos -- sensibilizados junto con listerias por vía endovenosa, la actividad fagocitaria de los macrófagos peritoneales aumenta (Mackness, 200). Cualquiera que sean los factores liberados por los/ linfocitos sensibilizados en presencia de antígeno, es probable/ que sean responsables de la movilización de los fagocitos a nivel del foco infeccioso y de su activación.

Todos los mecanismos, por tanto, que perturban a cualquier nivel los mecanismos de desarrollo de la resistencia celular adquirida o la activación de los macrófagos a cualquier nivel, se traducen en una mayor sensibilidad a contraer la enfermedad.

Esto puede ser el caso por el que los mayores porcentajes de enfermos de listeriosis se produzcan en pacientes inmunodeprimidos, y en particular en sujetos con una corticoterapia intensa (Gray y col., 133, Gantz y col., 108).

Así se ha comprobado que la inoculación de listerias en cobayas tratadas con cortisona, les provoca la enfermedad, aunque de un modo natural sean refractarios a padecer la enfermedad (Nordland, 1960, 218). En el ratón la hidrocortisona reduce la DL50 de 1.000 a 10.000 veces (Miller y col., 212), hecho que podría ser debido según Allison y col. (6) a la dificultad de movi

lización de los macrófagos por la supresión de la diapedesis de los leucocitos sanguíneos.

Frenkel, sin embargo, opina que este incremento en la susceptibilidad a contraer la enfermedad podría deberse a la inhibición de la respuesta proliferativa normal del sistema retículo endotelial en presencia de estímulos bacterianos, o a una posible disminución de la destrucción intracelular de las listerias fagocitadas.

Sobre todo, la acción de los corticoides depende de la dosis empleada; dosis normales, provocan un efecto antiinflamatorio periférico caracterizado por la supresión de la reacción cutánea de hipersensibilidad retardada con persistencia de la capacidad, por parte de las células linfoides, de transmitir la hipersensibilidad retardada a un nuevo receptor, según Cummings y col., (62); dosis más altas provocan una hipoplasia del sistema linfóide con disminución del número de linfocitos circulantes, acción favorecedora de la infección listeriana que se ha comprobado la producen también los agentes alquilantes y algunos anti-mitóticos.

Se ha visto que en ratones infectados por listerias la administración de Vimblastina durante las primeras horas de la infección impide el desarrollo de la resistencia celular adquirida, e inhibe la infiltración celular a nivel del foco infeccioso según North (229).

El desarrollo de la resistencia celular también se suprime con inyecciones de Ciclofosfamida, 6 Mercaptopurina y con dosis continuadas de Metotrexato; sin embargo, el tratamiento por Ciclofosfamida, Vimblastina o Metotrexato de 4 a 7 días antes de producir la infección, produce un aumento paradójico de la resistencia a la infección, según Tripathy y col., (310).

Circunstancias todas, por las que quedaría explicado fehacientemente el hecho incuestionable observado por muchos auto-

res, que en ciertas enfermedades como: Hodgkin, Linfossarcoma, Re  
tículosarcoma, Leucemia linfoide crónica, etc., que se acompa--  
ñan de un déficit inmunitario agravado por los tratamientos cito  
tóxicos, corticoterapia y radioterapia, así como todos aquellos/  
procesos de trasplantes en que se necesiten fuertes tratamientos  
inmunodepresores, la incidencia y prevalencia de la enfermedad -  
es muchísimo más alta, según Touraine y col., (309), Gray y - -  
col., 1.966 (133), Brennaas y col., 1.959 (40), entre otros.

### III.2. PATOGENICIDAD Y ENFERMEDAD EXPERIMENTAL

La patogenicidad de los microorganismos del género Listeria es muy variable, ya que depende de una gran diversidad de condiciones (Gray y col., 133).

En líneas generales podemos afirmar que Listeria monocytogenes (al menos las cepas hemolíticas) es patógena para una gran variedad de animales, pudiendo cursar con una sintomatología diversa, que incluye encefalitis, meningitis, conjuntivitis, neumonía, abortos, septicemia, endocarditis, abscesos y procesos purulentos localizados (Seeliger, 278).

Listeria denitrificans puede ser patógena para el ratón y la rata tras la inoculación intraperitoneal. L. grayi normalmente no es patógena ni siquiera para el ratón tras una inyección intraperitoneal o intradural, aunque la inoculación intraperitoneal de  $5 \cdot 10^8$  gérmenes de la cepa C57/ Leaden puede resultar virulenta para el ratón de 20 g.

L. murrayi no es patógena para el ratón por vía intravenosa, ni por vía intraperitoneal con un inóculo de  $10^8$  células -- (Bergey's Manual 43). Sin embargo, y pese a los datos de anterior referencia, pasó mucho tiempo antes de que se llegara a reproducir experimentalmente las lesiones y síntomas meningoencefálticos que se conocen en la enfermedad natural, tanto en rumiantes como en monogástricos. De modo fortuito se conseguía a veces con inyecciones intranasales, intracarotideas o instilaciones conjuntivales, pero sin conseguir repetibilidad en los resultados (Asahi y col., 11, Graham y col., 119, Gray y col.,/ 123 y 129).

Gray y col. (126) consiguieron en 1.952 reproducir los síntomas de meningoencefalitis pura, que se produce en rumiantes, practicando para ello una inoculación simultánea de L. monocytogenes por vía intracerebral y Clortetraciclina por vía --

intravenosa, a la dosis de 5 mg/Kg de peso. En estas circunstancias las listerias se multiplican en el cerebro sin extenderse al resto del organismo, debido probablemente a la acción inhibidora de la Tetraciclina.

Sin embargo, fueron Olson y col. en 1.957 (225), quienes/ de un modo más natural consiguieron reproducir este cuadro en rumiantes al aislar de la sangre de rebaños de ovejas enfermas/ de listeriosis y en los ganglios linfáticos y sangre de vacas - afectadas por la enfermedad de las mucosas, un agente que denominaron: "Listeriosis-Enhancing-Agent" (LEA).

Este agente exaltante de la listeriosis (LEA), de naturaleza aún no bien definida, al ser inoculado por vía intranasal/ junto con un cultivo de L. monocytogenes, originaba un cuadro - de encefalitis en al menos un 8% de los animales expuestos.

### III.3. VACUNAS

Como ya quedó expuesto en el capítulo de Biología de la infección listeriana, parece totalmente evidente que para conseguir una cierta inmunidad por parte de los animales frente a la listeriosis, así como frente a otras infecciones producidas por parásitos intracelulares, se hace necesario padecer de alguna -- forma la infección (Hasenclever y col., 144, Jenkin y col., 164), ya que las inoculaciones con gérmenes muertos no parecen ser capaces de desarrollar resistencia celular adquirida (Hobson, 146, Holland y col., 148).

Así mismo, la resistencia a la enfermedad parece que no se transfiere mediante la inoculación de suero de animales inmunes (Osebold y col., 230, Miki y col., 209). Por lo que, la única posibilidad práctica de conseguir una cierta inmunidad en los sujetos receptibles, parece ser que es mediante la inoculación -- con vacunas vivas. Ahora bien, el empleo de este tipo de vacunas de forma masiva, tropieza con grandes restricciones por parte de las autoridades sanitarias de algunos países, hasta el punto que según nuestras referencias, no se han ensayado vacunas vivas atenuadas en pruebas de campo más que en unos cuantos países del bloque socialista europeo, destacando el programa de vacunación del ganado ovino que se sigue en Hungría, bajo los auspicios del Profesor Ivanov (158). En este país, se han vacunado  $2.10^6$  ovejas durante los años 1.980 y 1.981, no observándose ningún tipo de lesión ni en ovejas preñadas o en lactación, ni en corderos, habiendo conseguido hacer descender el índice de listeriosis de los rebaños vacunados, desde el 10% al 0,1%.

También han puesto en marcha una técnica demostrativa -- de la inmunidad producida por las cepas vacunales, mediante instilaciones en la conjuntiva de cobayas y conejos, primero de la cepa vacunal y a los 8 días de cepas patógenas de L. monocytoge-



nes produciéndose una inmunidad local en el ojo tratado con la - vacuna (Ivanov y col., 154).

Ultimamente se vienen probando también, aunque a título experimental en animales de laboratorio, vacunas inactivadas por calor de algunas cepas de listerias junto a adyuvantes polianiónicos. Y si bien está largamente probada la no inmunización de/ los animales inoculados con listerias muertas, la adicción de li popolisacáridos, sulfato dextrano y suramina parece ser que mues tra cierto efecto positivo, favoreciendo la inmunización, sopor-- tando los animales tratados por este sistema la inoculación de - hasta 20 veces la dosis letal cincuenta de la misma cepa.

El coadyuvante completo de Freund parece no tener nin-- gún efecto al respecto (Van del Meer y col., 205, Van Dijk y - - col., 74).

#### III.4. FUENTES Y VIAS DE LA INFECCION

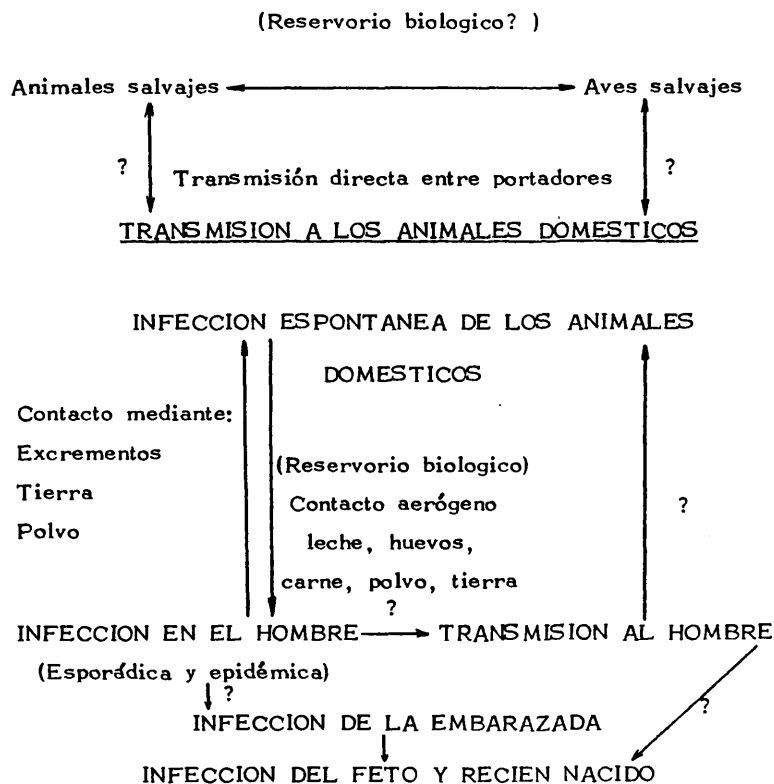
A pesar de los grandes avances en el campo diagnóstico/ sobre listeriosis y los logros obtenidos en el campo de la terapia antimicrobiana, la listeriosis sigue siendo una enfermedad - potencialmente peligrosa en el mundo occidental para el hombre y los animales domésticos, donde cada año son más numerosas las co municaciones sobre afectados, muertos y lesionados irreversiblemente por esta enfermedad.

Veintisiete años han transcurrido ya desde que el profesor Seeliger propusiera un primer esquema sobre la epidemiología de esta enfermedad, que empezaba a preocupar por entonces a las/ autoridades sanitarias de los diversos países, y hoy por hoy siguen sin despejarse la mayoría de los interrogantes por él planteados (cuadro nº 2), y así en 1.982, el mismo Seeliger (285b),/ plantea un nuevo esquema epidemiológico (cuadro nº 3), en el que junto a hechos muy probados coexisten lagunas y puntos oscuros - en los distintos mecanismos de transmisión y mantenimiento de la enfermedad, quedando sin explicación detalles a primera vista -- tan simples, como es el que los brotes epidémicos tengan lugar - en distinta época del año para el hombre que para los animales,/ o qué factores deben conjuntarse para que en unos casos se desarrolle la enfermedad y en otros no.

Sin embargo y a pesar de la gran ubicuidad de los microorganismos del género Listeria, la enfermedad suele ser esporádica o suavemente endémica con una incidencia baja. De ahí que -- Simpson en 1.971 (291) les calificara como agentes oportunistas, por ello hoy día se consideran casi con mayor interés los factores predisponentes de la enfermedad que la simple presencia de - listerias en determinados sustratos, y esta es la razón por la - que Seeliger en 1.972 (281) propusiera la consideración para estos microorganismos de epifitos y no de verdaderos parásitos.

CUADRO Nº 2: EPIDEMIOLOGIA Y EPIZOOTOLOGIA DE LA  
LISTERIOSIS

INCIDENCIA EN ANIMALES

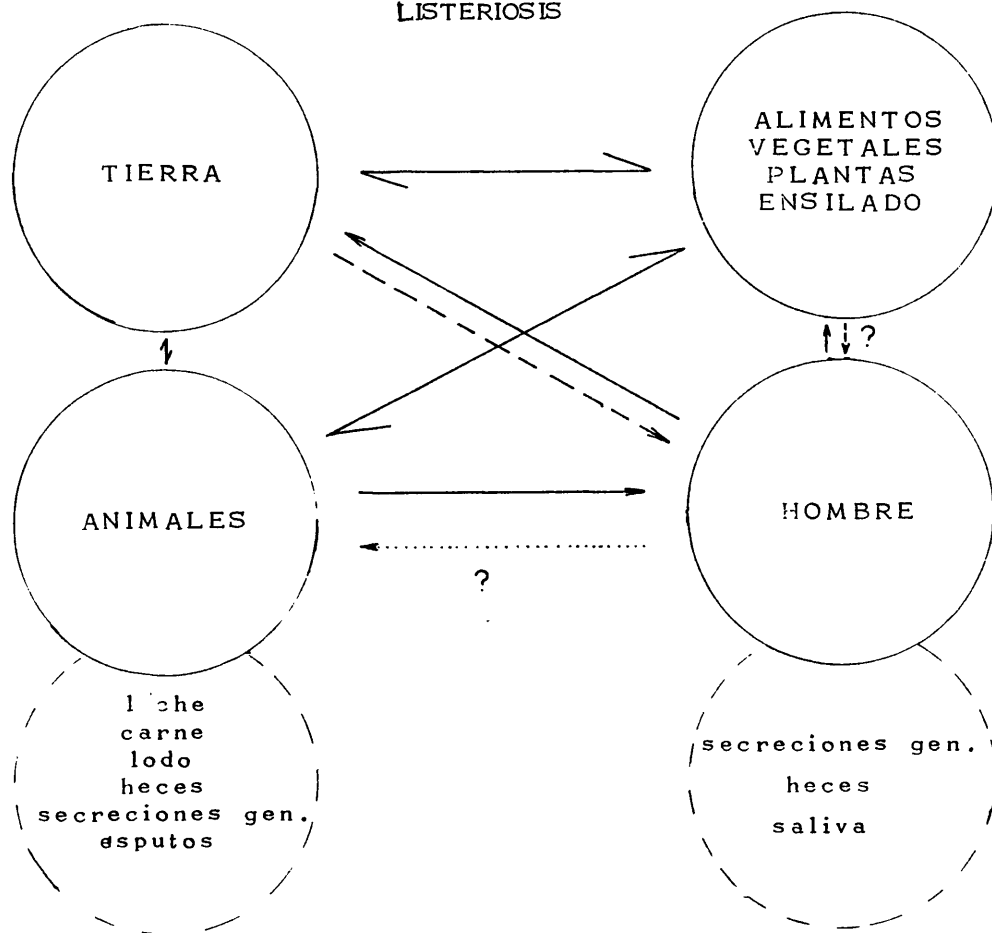


HABITAT NATURAL NO DEFINITIVAMENTE CONOCIDO

¿Suelo o plantas?

(Seeliger, 277a)

CUADRO Nº 3: EPIDEMIOLOGIA Y EPIZOOTOLOGIA DE LA  
LISTERIOSIS



Prevalencia Estacional

ANIMALES	HOMBRE
otoño - invierno	primavera - verano

En numerosos trabajos y como ya ha quedado expuesto, se han encontrado listeriosis clínicas en 50 especies de mamíferos/ y aves, y se han aislado listerias de reptiles, peces, crustá-- ceos, artrópodos, sanguijuelas, caracoles y otros moluscos, - - efluentes y suelo.

En áreas endémicas se han descrito títulos de aglutina-- ción en suero superiores al 84% para el ganado vacuno, 43% para/ los cerdos, 35% en las ovejas y 40% en el hombre (Elischerova y/ col., 86).

La mayoría de los autores coinciden unánimemente en que el número de portadores fecales en las distintas zonas y espe-- cies excede del 10%, aislándose frecuentemente de ganglios mesen-- téricos de vacas, cerdos y ovejas "normales". Siendo los pája-- ros, zorros, roedores y otros animales salvajes quienes juegan - el papel más importante en la diseminación del germen.

Las aves domésticas criadas intensivamente constituyen/ un reservorio importante, bien por ellas mismas o a través de la yacija y excrementos.

Durante un tiempo se consideró que había un riesgo ocu-- pacional importante en relación con la probabilidad de contraer la enfermedad por parte de carniceros, empleados de mataderos de pollos y profesionales del sector pecuario, y así, en un trabajo de Osebold y col. en 1.955 (228b) se observó que un grupo de ve-- terinarios en California poseían títulos aglutinantes importan-- tes en un 77%, aunque Kampelmacher y col. en 1.972 (168) aisla-- ron Listeria monocytogenes en porcentajes parecidos tanto en las heces de trabajadores de un laboratorio, como de las heces de - oficinistas, por lo que se deduce que deben existir factores de - susceptibilidad especiales por parte del hospedador, o de viru-- lencia por parte del germen, para contraer la enfermedad, pues - se ha comprobado además, que el contacto con los pollos y la in-- gestión e inhalación del material contaminado por tierra y heces

incrementa el número de portadores, pero no el número de enfermos sintomáticos (Hyslop, 1.974, 153).

Por otra parte, las cepas aisladas de las heces suelen diferir bioquímicamente y serológicamente, y presentan menor virulencia que las aisladas de focos infecciosos (Kham y col., - - 181).

No obstante y a pesar de lo expuesto, debemos considerar la parte distal del intestino de los animales homeotermos como un reservorio importante de los microorganismos de este género.

Como factores predisponentes en la infección clínica se han mencionado muchos. Entre los más importantes y más ampliamente reconocidos podemos mencionar las enfermedades intercurrentes, el estrés y la gestación; este último de máxima importancia como factor potencial para el padecimiento y transmisión de la enfermedad aún en animales aparentemente sanos. Así no es raro observar en ovejas recién paridas edema en los cotiledones y ligeras placentitis, aunque se considera como fuente más probable del aborto una infección del líquido amniótico, vía arteria uterina y aspiración del microorganismo por el feto según Njoku y col. (217b).

En cuanto a las variaciones estacionales de portadores/inaparentes y enfermos, en el ser humano se ha observado que en los países fríos y templados se producen incrementos importantes en verano tanto en el número de enfermos como en el porcentaje de portadores (Hyslop, 153), sin duda debido a una mayor concentración de los efluentes y a existir en el medio ambiente una mayor carga de polvo y aerosoles. En los animales, sin embargo, - estos incrementos se producen a finales de invierno y comienzos de primavera.

En este sentido, en un estudio realizado por Ivanov en Bulgaria sobre el estado de la enfermedad entre los años 1.961 y

1.976, se observa que entre los meses de febrero y mayo se producen más del 80% de los casos, considerando en verano la incidencia como mínima (Ivanov y col., 157). Las causas de esta situación podrían explicarse por una alimentación de peor calidad y - más contaminada durante estos periodos, así como por el cambio - de alimentación durante la primavera.

Para resumir, Hyslop propone como causas desencadenantes de la enfermedad en los países de nuestra área, junto con -- las ya aducidas, el "stress" provocado por el frío, por la estabulación, por el parto y otros tipos de "stress" diversos que se han señalado, como son las molestias digestivas y procesos enterotóxicos provocados por E. coli (Rolle y col., 264).

También se han señalado como causas predisponentes, la aparición en esta época de enfermedades víricas intercurrentes, / como la rinotraqueitis y algunas enfermedades producidas por virus del tipo parainfluenza-3 y herpesvirus, que suelen ser enzooticos en la mayoría de los países y que al lesionar las mucosas y producir una disminución de las defensas, incrementan la - receptividad de los animales a contraer la enfermedad.

Nada despreciable tampoco debe ser la aportación de tábanos, moscas, pulgas, garrapatas y otros insectos hematófagos - en la diseminación, propagación y mantenimiento de la enfermedad, pues en numerosos trabajos se ha puesto de manifiesto la presencia de L. monocytogenes en el tracto gastrointestinal de estos - insectos (Demyanchenco y col., 70), e incluso la reproducción de las listerias en la sangre succionada por algunos hematófagos, - manteniendo hasta 6 meses e incrementando incluso la virulencia/ de la cepa absorbida por ellos (Harbov y col., 139 y 140).

Otro medio importante para el mantenimiento de la enfermedad lo constituyen las aguas residuales, efluentes, barro, - - hierba, heno y ensilados, en los que son capaces de sobrevivir las listerias hasta 10 años, e incluso con buenas condiciones de hu-

medad y temperatura, de reproducirse (Elischerova y col., 87 y -- Dijkstra, 75).

La presencia de microorganismos del género Listeria en/ el ensilado, se ha considerado desde siempre como causa directa/ de los brotes epidémicos de listeriosis en ovejas y vacas (Olson y col., 223, Gray, 131, Blendon y col., 29). Circunstancia que/ se ve corroborada tras la experiencia de Nicholas y col. en 1972 (216), en que un brote en un rebaño de ovejas alimentadas con en silado de maíz, desapareció tras la interrupción del suministro, recomenzando al suministrar el ensilado. Con posterioridad ha si do también señalado por Loken y col. en 1.981 (194) en Noruega - en un rebaño de vacas alimentado con forraje.

La presencia de microorganismos del género Listeria en/ el ensilado, se ha observado que es realmente alta y su correlación con la enfermedad es desde luego evidente, no conociéndose/ todavía suficientemente el mecanismo por el cual se desarrolla - la listeriosis en unos casos y no en otros.

En Holanda el 30% de los rebaños en que se produjeron - brotes epidémicos estaban alimentados con ensilados que conte- - nían L. monocytogenes (Dijkstra 1.965 citado por Hyslop, 153). Lo probable es que las listerias se encuentren en la hierba al - ser cortada, y un mal almacenamiento y un pH inadecuado (6,5 o - mayor) favorezcan su multiplicación. Es mucho más frecuente la/ aparición de listerias en silos de tipo zanja y trinchera que en los de tipo torre, posiblemente por una mayor contaminación con/ tierra y material fecal en el momento de su almacenamiento, aun- que también se han aislado de los exudados de silos torre, y se/ ha producido la enfermedad en granjas con este tipo de silos; --, acaeciendo los brotes cuando se estaba alimentando el ganado con el ensilado húmedo y de baja calidad de las cepas inferiores. - Por este motivo y porque la simple alimentación del ganado con - ensilado contaminado no es causa suficiente para producir la en-



fermedad, se piensa que deben existir otras causas predisponentes.

En cuanto a las condiciones climáticas, se ha observado que la incidencia en los trópicos es menor que en los países templados, a pesar de que existan unas condiciones higiosanitarias más deficientes y una mayor exposición a insectos hematófagos. La razón de ello parece residir en las condiciones ambientales y de manejo, más que en una resistencia especial del ganado autóctono, con un tipo de explotación extensivo y en consecuencia con menor hacinamiento de los animales, peores comunicaciones, ausencia de "stress" por frío (aunque teóricamente el ganado vacuno soporta mejor temperaturas bajo 0°C que superiores a 27°C), alimentación con pastos y no con ensilados y falta de medios diagnósticos sobre todo, ya que se ha comprobado que el 55,3% de los sueros remitidos de África del Sureste para control rutinario de otras enfermedades poseían títulos altos frente a L. monocytogenes, circunstancia que parece indicar que parte de los animales muestreados sí habían tenido contacto con L. monocytogenes (Hyslop, 1953).

En cuanto a la edad de los animales afectados, se ha verificado que en el ganado europeo se produce una mayor incidencia antes del año. Es frecuente en animales de hasta cuatro años y medio y muy rara en los de más de seis años, mientras que en los cebuinos es rara en animales mayores del año.

En los países tropicales con rabia endémica, el diagnóstico diferencial entre rabia y las formas meningoencefálicas de listeriosis según Averí y col. (12), supone un problema importante, pues incluso ambas enfermedades pueden padecerse de forma simultánea (Gray y col., 1966, Weiss, 1960).

Otro método de contagio nada despreciable es a través de la secreción láctea. En este sentido, aunque la mayoría de los fetos humanos y animales se infectan en el útero, no es raro

que animales nacidos sanos contraigan listeriosis mortales 7 - - días después del nacimiento (Jack, 160).

Wramby en 1.944 (326) y Hyslop y col. en 1.959 (151) -- aislaron listerias de la leche de vacas aparentemente sanas y -- postularon que las listerias podrían aparecer en la glándula mamaria con posterioridad a una bacteriemia, e incluso, persistir/ durante varias lactaciones de forma intermitente. Schultz en -- 1.967 (276) recolectó leche de 1.004 vacas, encontrando L. monocytogenes en 10 de ellas que pertenecían a 8 de las 25 vaquerías muestreadas; entre las portadoras sólo 2 manifestaban ligeros -- síntomas de mamitis. Con posterioridad estos resultados han sido corroborados por Vizcaino y col. en 1.974 (313) en Córdoba, - Jansen y col. (162) y Sipka y col. (292), entre otros.

Aunque se ha comprobado la transmisión del germen a través de la secreción láctea, no se ha podido demostrar de modo claro y fehaciente la transmisión de la enfermedad en niños y -- animales. Con fuertes dosis infectivas por vía digestiva se ha evidenciado en ratón y cobaya, una colonización intestinal a nivel de las placas de Peyer, difundiendo con posterioridad los/ gérmenes al hígado y al resto del organismo, dando lugar a micro abscesos, sobre todo en el hígado.

No se ha conseguido reproducir la enfermedad en terneros a los que se les suministraba la leche contaminada vía sonda gástrica o por inyección intrarruminal.

Se ha sugerido por Asahi y col. (11), Olson y col. - - (225), Gray (128) y Borman y col. (35), que la enfermedad meningoencefálica se produciría por una contaminación de heridas pre-existentes en la cavidad bucal, ascendiendo el germen hasta el - cerebro por las ramas del trigémino.

Además de las rutas expuestas se ha señalado que la infección puede sobrevenir a una contaminación por aerosoles bien/ de leche, polvo o de otros líquidos contaminados que alcanzan la

cavidad nasofaríngea y que acceden al cerebro por vía transetmoidal a través del primer par craneal; la inhalación de gotículas/ se ha observado en lactantes glotones que al mamar aspiran leche, y para demostrarlo Hyslop en 1.961 (152) realizó un experimento/ con 15 terneros sin anticuerpos antilisteria detectables en el suero, a los que hizo inhalar un aerosol de leche contaminada -- con L. monocytogenes serotipo 4, aislada de un caso de encefalitis. Antes de las 4 semanas, 3 terneros habían contraído la enfermedad de forma meningoencefáltica, uno más en forma encefalítica y de otro se aislaron listerias sin observarse sintomatología alguna. En el estudio en ningún momento se inocularon a los animales con LEF.

Aun con estos datos la contaminación a través de los pares craneales 1 y 5 no parece ser con mucho exclusiva, ya que en el ratón se ha evidenciado también una fase neumónica tras la inhalación, dependiendo la gravedad de la infección de la dosis infectante (Truitt y col., 312); tampoco está descartado que tras la inhalación pueda haber una fase epitelial del tipo de la descrita por Racz y col. en 1.974 (247).

En cualquier caso, lo cierto es que el consumo de leche cruda de vaca únicamente se produce en áreas rurales y países -- subdesarrollados, y el tratamiento térmico minimiza el riesgo -- por parte de los consumidores humanos.

Es preciso recordar, no obstante, que los microorganismos del género Listeria, son unos de los más resistentes al tratamiento térmico, dentro de los gérmenes no esporulados, ya que/ tienen una cierta resistencia a sobrevivir a tratamientos de -- 61,7°C durante 35 minutos (Bearn y col., 18), no teniendo por -- qué ser más efectivos los modernos tratamientos HTST. En caso -- de sobrevivir al choque térmico, las condiciones de almacenamiento a baja temperatura favorecerían el desarrollo de estos microorganismos.

Con todo y a pesar de la ubicuidad del germen, de su --  
resistencia y de sus posibilidades de contagio, parece que la in  
cidencia de la enfermedad, aún siendo preocupante, no alarma de/  
momento a las autoridades sanitarias, debido quizás a que la ma-  
yoría de las cepas "ambientales" parecen no ser patógenas (Khan/  
y col., 181). Aunque más bien deberíamos hablar, tras los traba-  
jos de Manev y col. en 1.981 (202) presentados en el último Con-  
greso de Listeriosis, de cepas de alta y baja virulencia, no pa-  
reciendo de momento ser necesaria la medida sugerida por el pro-  
fesor Mero (207), también en este último Congreso, de tratar quí-  
mica o térmicamente todas nuestras aguas residuales para dismi-  
nuir la prevalencia de la enfermedad.

#### IV. MATERIAL Y METODOS

##### IV.1. INTRODUCCION

El presente estudio tiene su origen en un proyecto de investigación sobre el grado de contaminación de nuestro ganado de abasto por las distintas especies de microorganismos del género Listeria, llevado a cabo en nuestro Departamento, a partir del año 1.977.

Durante el desarrollo de dicho trabajo, fueron cobrando una nueva dimensión algunos aspectos parciales del tema en estudio.

Uno de ellos, el principal tal vez, se refiere a la -- problemática de aislamiento de los distintos microorganismos -- del género, que nos puso de relieve la conveniencia de modificar ligeramente las técnicas clásicas de recogida y aislamiento de estas bacterias.

Una vez superado este escollo inicial, el trabajo se -- centró en la realización del muestreo y la tipificación bioquímica de las distintas estirpes conseguidas.

El presente trabajo pues, podríamos dividirlo en tres/ partes netamente diferenciadas:

La primera etapa se inició en el año 1.977, y en ella/ se encuestaron los medios y técnicas de cultivo descritos en la bibliografía, a fin de evaluar la eficacia del método a emplear (Suárez, Domínguez y Mamolar, 302, 303).

La segunda etapa comprende desde el año 1.977 hasta finales de 1.980, en la que se procesaron 1.100 muestras de heces ovinas, 750 bovinas y 234 sueros de ambas especies, todas ellas recogidas en mataderos de animales que no presentaban ningún tipo de lesión anatomopatológica. Al mismo tiempo se continuó -- con la caracterización de los distintos microorganismos del gé-

nero y se consiguió poner a punto una técnica analítica que permitió optimizar los resultados de los aislamientos.

La tercera y última etapa concluida en Enero de 1.982/ se comenzó a finales del año 1.980 y consistió en el análisis - sistemático y continuado durante un año de un rebaño de ganado/ lanar, de unas 300 cabezas, en el que no se había dado brote alguno de listeriosis, y que no había sufrido ningún tipo de tratamiento antibiótico sistemático en el año anterior a la toma - de muestras. Aplicando ya la nueva metodología de aislamiento/ desarrollada en el Departamento, así como la técnica habitual - para, en su momento, si era posible, poder extrapolar resulta-- dos. Al mismo tiempo y como los animales permanecían vivos, poder seguir la evolución en caso necesario de los portadores.

Así mismo, en las tres etapas todas las cepas aisladas fueron sometidas a un estudio bioquímico y de sensibilidad a -- distintos antibióticos, así como de patogenicidad para distin-- tas especies animales.

#### IV.2. LUGAR DE TRABAJO

El trabajo que presentamos se llevó a cabo prácticamente en su totalidad en las dependencias del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Madrid, con los 16 gicos desplazamientos para las tomas de muestras y observación/ de los animales encuestados, que se realizaron en el matadero municipal de Madrid (Legazpi) y en un rebaño de ganado ovino de la zona nordeste de la provincia de Cáceres.

#### IV.3. MATERIALES

Como material de laboratorio se utilizó el propio de un laboratorio de microbiología en este tipo de trabajos: frascos de vidrio estériles, neveras portátiles, estufas a varias temperaturas, autoclaves, hornos Pasteur, tubos de ensayo de diversos diámetros, placas de Petri, matraces de diversos tamaños, agitadores calentadores magnéticos, asas de platino, pipetas de diversas graduaciones, balanzas, microscopios, material de necropsia, diverso material de inoculaciones, incluso trépanos y trócares, jaulas para animales de laboratorio, etc.

Un instrumento básico y de gran utilidad, hasta el punto que se nos hizo imprescindible para trabajar en la selección de las presumibles colonias de listerias, lo constituyó el equipo de la lupa binocular estereoscópica Wild 376788 con su equipo fotográfico. Así mismo para los trabajos de ultramicroscopía, utilizamos un microscopio Jeol mod. 100B, un vaporizador Jeol - Jee 4B y un ultramicrotomo LKB Ultratome III. Los medios y reactivos empleados fueron los siguientes:

Equipos de tinción por Gram, equipos de tinción simple, solución Ringer, solución salina, medios de recogida, enriquecimiento y aislamiento, caldo levadura glucosa lemco, agar sangre, solución Mayer-Croft, solución Alsever, medio semisólido para movilidad, medio de reducción de nitratos, suero de Loeffler, agua de peptona, discos de beta-galactosidasa y tiras "pathotec" de oxidasa, agua oxigenada a 30 volúmenes, leche tornasolada, leche con azul de metileno 0,1%, medio para fermentación de azúcares, reactivos de Griess-Ilosvay, Kovacs y Barritt, medios para las distintas pruebas de inhibición y medio para comprobar hidrólisis de gelatina y almidón, sueros antilisteria de distintos tipos, incluso marcados con fluoresceína, antígenos somáticos de distintos serotipos y especies de listeria, ce



pas de referencia remitidas por los profesores Seeliger e Ivanov, animales de laboratorio (ratones, conejos, cobayas y cricetos), así como dietas equilibradas para los mismos.

Las incubaciones se realizaron en unos márgenes de - - temperaturas que oscilaron entre los 4°C y 40°C y las sustancias que lo requirieron se mantuvieron en nevera a 4°C o en congelación a -28°C.

#### IV.4. METODOS GENERALES DE AISLAMIENTO

##### IV.4.1. Primera etapa

En esta primera etapa y con el objeto de estudiar el comportamiento de las listerias en los medios de cultivo recomendados por la extensa bibliografía, y poder llegar a una conclusión valedera de nuestras condiciones de trabajo en cuanto a la utilización de sustancias inhibidoras, temperatura y tiempo/ de crecimiento, decidimos reproducir las condiciones de un co--procultivo al que previamente se había inoculado con listerias. A continuación sometimos a ensayo los medios de cultivo de más/ amplia difusión y aval bibliográfico.

El esquema general del trabajo fué el expuesto en el -cuadro número 4.

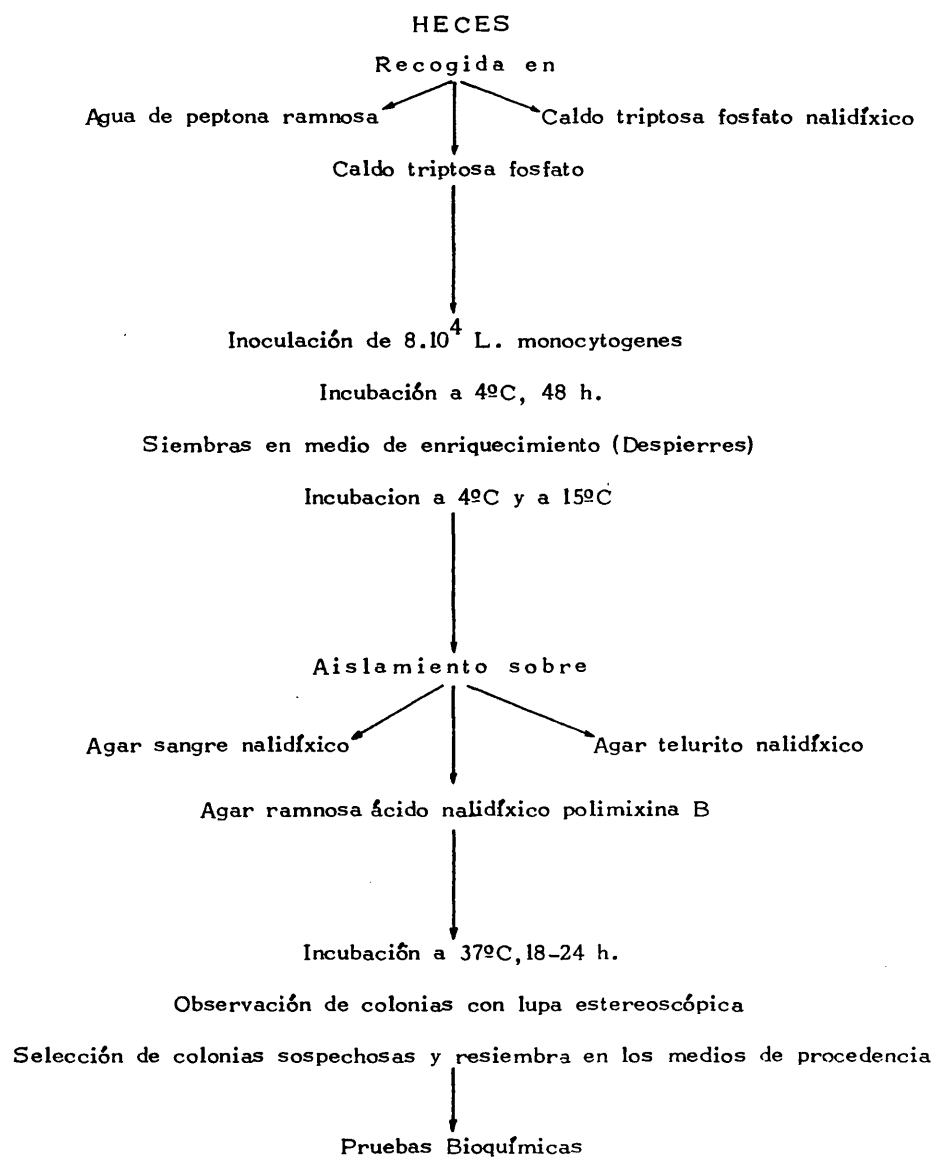
Las heces se recogieron en el Matadero Municipal de --Madrid (Legazpi), procedentes del último tramo del recto de ganado bovino. Operando en condiciones asépticas, se recogió una/ cantidad aproximada de 10 gramos por animal, distribuyéndose --partes alicuotas en nueve tubos, tres para cada uno de los si--guientes medios:

Agua de peptona ramnosa, Caldo triptosa fosfato y Caldo triptosa fosfato ácido nalidíxico.

Una vez en el laboratorio, los tubos fueron inoculados con 1 ml de una suspensión de listerias. Los homogenizados de/ listeria se prepararon con cepas de Listeria monocytogenes beta hemolíticas y no hemolíticas de los serotipos 1/2a y 4a, respectivamente, después de practicar una serie de diluciones que con --tamos sobre placa por el método de Miles y Misra (cit. por --Gaston, 110).

De las diluciones que contenían aproximadamente  $8.10^4$  células, tomamos 1 ml que lo sembramos en 6 de los 9 tubos reco

CUADRO Nº4: SISTEMATICA DURANTE LA PRIMERA ETAPA



gidos de cada animal (1 por cada cepa y medio respectivamente), reservando un tubo de cada medio como testigo ante la posibilidad de que las heces en origen pudieran contener listerias; los tubos así inoculados permanecieron a 4°C hasta su resiembra.

Enriquecimiento: Transcurridas 48 horas desde la toma/ de muestra, transferimos asepticamente 1 ml de cada medio de re cogida al medio de enriquecimiento propuesto por Despierres - - (71), el cual fué incubado a 4°C y 15°C.

Una vez transcurridos 15 días desde la inoculación en/ el medio de enriquecimiento, procedimos a efectuar aislamientos semanales a lo largo de 9 semanas sobre Agar sangre ácido nalidíxico, Agar telurito potásico ácido nalidíxico y Agar ramnosa/ polimixina B ácido nalidíxico (Despierres, 71).

#### IV.4.2. Segunda etapa

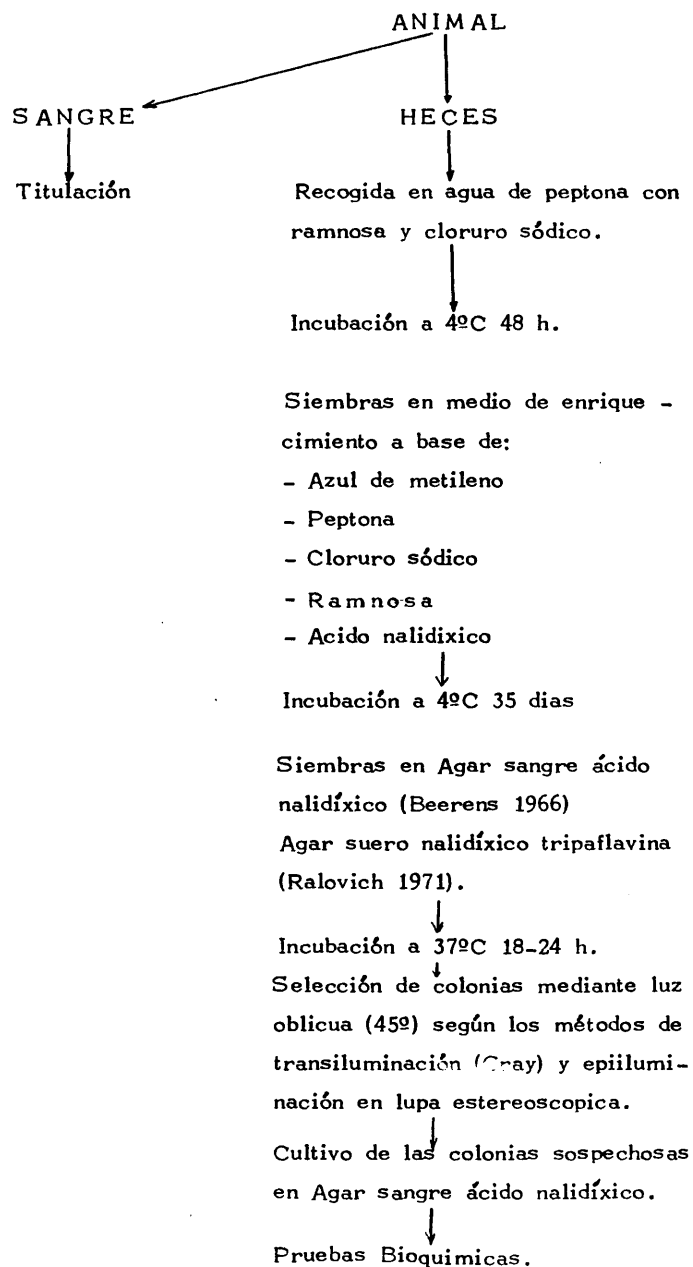
Durante esta fase se recogieron 1.100 muestras de he-- ces de origen ovino, 750 de origen bovino y 234 sueros de ambas especies. En esta etapa utilizamos ya los medios y técnicas -- que nos habían rendido mejores resultados en la etapa anterior/ y al mismo tiempo seguimos trabajando en el perfeccionamiento - de los mismos.

El esquema de trabajo puede resumirse según se expone/ en el cuadro número 5.

Recogida de muestras: Aprovechando la cadena de traba- jo del matadero y en condiciones lo más asépticas posibles, re- cogíamos en la zona de sangría, en matraces previamente calenta- dos para evitar la hemólisis, entre 25-30 ml de sangre por ani- mal, despreciando las primeras y las últimas porciones, asignán- doles un determinado número de referencia.

Ya en la zona de evisceración, realizamos la recogida/ de heces de los últimos tramos del recto, con un guante estéril

CUADRO Nº5: SISTEMATICA DURANTE LA SEGUNDA ETAPA



de un solo uso, depositándolas en tubos que contenían Agua de - peptona ramnosa y cloruro sódico, a razón de un gramo aproximadamente por 20 ml del medio.

Así mismo, controlamos la inspección sanitaria de los/ animales objeto del muestreo, con el fin de observar las posibles anomalías anatomopatológicas que pudieran presentar. Una/ vez en el laboratorio, las heces se resembledaban en el medio de/ enriquecimiento con ramnosa, azul de metileno, peptona, polimixina B y ácido nalidíxico (Despierrez, 71), llevándolas a incubar a 4°C por tiempo variable y hasta seis meses como máximo; - los aislamientos se hicieron sobre Agar sangre nalidíxico (Beers y col., 19) y Agar suero nalidíxico tripaflavina (Ralo-- vich, 248) y la incubación a 37°C durante 24 horas.

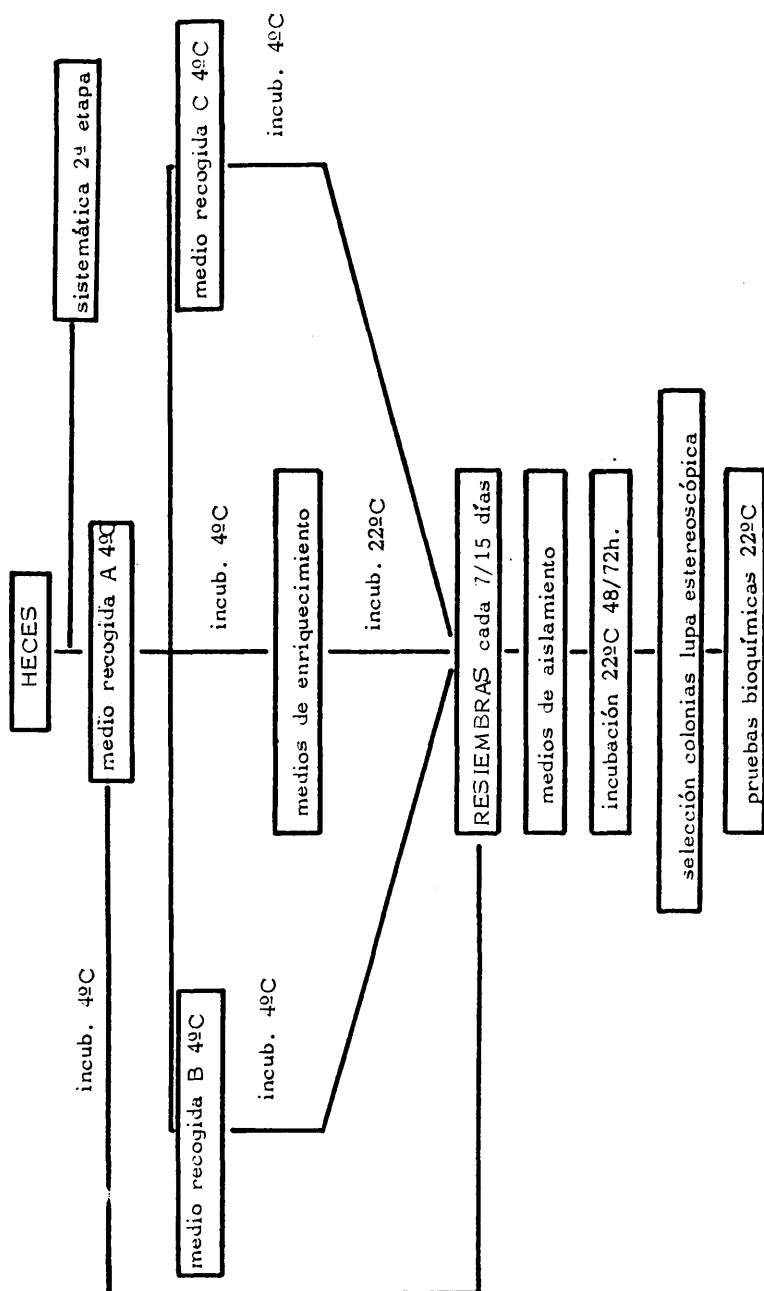
#### IV.4.3. Tercera etapa

En esta tercera etapa se pretendió un análisis sistemático de un rebaño de unas 300 ovejas sin historia presente ni - pasada de listeriosis; para ello se muestrearon un total de 100 ovejas (33,3% del rebaño) de forma continuada, aplicando ya la/ nueva metodología que se había venido ensayando en el laboratorio, así como la técnica utilizada en la segunda etapa, con el/ fin de poder comparar entre sí los resultados obtenidos.

De forma esquemática podemos resumirla en el cuadro número 6.

Recogida de muestras: Las heces recogidas del último/ tramo del recto con un guante de plástico estéril de un solo -- uso y en cantidad aproximada de un gramo, se depositaban en los recipientes que contenían 20 ml de los medios A y B de recogida que tienen como única fuente hidrocarbonada la trehalosa y - - ramnosa, respectivamente, estando levemente tamponados con fosfatos. Los medios tanto durante la toma de muestras como duran

CUADRO Nº6: SISTEMATICA DURANTE LA TERCERA ETAPA



te el transporte, permanecieron a 4°C.

Una vez en el laboratorio se procedió a homogeneizar + medios y heces, transfiriéndose asépticamente 4 ml del medio A al medio C de recogida, que contiene como fuente hidrocarbonada esculina y se colocan todos a incubar a 4°C. Pasadas 24 horas/ transferimos 2 ml del medio de recogida A a los medios de enriquecimiento A, B y C, que se colocaron a incubar a 22°C, permaneciendo los medios de recogida a 4°C. Los aislamientos comienzan sobre los medios A, B y C de aislamiento, ya a las 72 horas de la recogida de muestras y repitiéndolos cada 7 ó 15 días según los casos. La incubación se practicó a 22°C durante 48-72 horas.



#### IV.5. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios utilizados en la recogida, enriquecimiento/ y aislamiento, son los tradicionales para este tipo de estudios (Ralovich y col., 249, Despierres, 71), ligeramente modificados en cada caso tras una primera fase experimental, fundamentalmente a nivel de su enriquecimiento con azúcares fácilmente fermentables por las listerias y que no sean habitualmente hidrolizados por la flora entérica. Así mismo, se les tamponó levemente con fosfatos para que el pH estuviera siempre lo más próximo posible al óptimo de crecimiento de estos microorganismos.

De las múltiples composiciones ensayadas en la etapa - previa, seleccionamos tres medios de recogida, tres de enriquecimiento y tres de aislamiento.

Su composición y sistemática de preparación es la siguiente:

##### IV.5.1. Medios de recogida

###### Medio A:

Peptona (Difco) -----	5 g
Neopeptona (Difco) -----	5 g
Trehalosa dihidrato (Serva) -----	3 g
Cloruro sódico -----	10 g
Fosfato disódico dihidrato -----	11,83 g
Fosfato monopotásico anhidro -----	1,35 g
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,2-7,5

Se disuelven los componentes en 1000 ml de agua destilada y se ajusta el pH entre 7,2- 7,5 con soluciones de fosfato disódico y fosfato monopotásico al 16%; se esteriliza a - -

116°C durante 20 minutos, distribuyendo después de la esterilización a razón de 20 ml de medio en recipientes estériles de -- 60 ml de capacidad y se almacena a 4°C hasta su uso, previo control de esterilidad.

**Medio B:**

Peptona (Difco) -----	10 g
Rammosa (Serva) -----	2 g
Cloruro sódico -----	10 g
Fosfato disódico dihidrato -----	11,83 g
Fosfato monopotásico anhidro -----	3 g
Fosfato dipotásico -----	1,5 g
Agua destilada -----	1.000 ml

Se procede como en el medio anterior para ajustar el - pH, esterilizar y distribuir.

**Medio C:**

Peptona (Difco) -----	5 g
Neopeptona (Difco) -----	5 g
Esculina (Merck) -----	1 g
Fosfato disódico dihidrato -----	11,83 g
Fosfato monopotásico anhidro -----	2 g
Citrato férrico amoniacal -----	1 g
Cloruro sódico -----	8 g
Agar (Oxoid nº 1) -----	1,5 g
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,2-7,5

Se disuelve peptona, neopeptona, esculina y citrato férrico en 500 ml de agua destilada, se calienta a 110°C durante/ 15 minutos y se procede a su filtración para eliminar las sales alcalinotérreas, que han precipitado en el proceso de calenta--

miento. Se disuelven el resto de los componentes en los 500 ml de agua restantes y se colocan los 2 matraces a esterilizar por separado a 116°C durante 20 minutos. Se dejan enfriar hasta -- una temperatura de 50°C y se mezcla el contenido de los 2 matra-- ces comprobando que el pH quede comprendido entre 7,2 y 7,5; - si no es así, se ajusta con las mismas soluciones de fosfato di-- sódico y monopotásico de los medios anteriores. Con posteri-- ridad, se procede a su distribución aséptica en recipientes de -- 60 ml de capacidad a razón de 20 ml y se almacena a 4°C hasta - su uso.

A veces pueden precipitar ligeramente los fosfatos sobre todo en el medio A de recogida, no teniendo ninguna impor-- tancia en la actividad del medio, si como decimos, el precipita-- do es muy ligero, de tal manera que el pH quede minimamente - - afectado.

#### IV.5.2. Medios de enriquecimiento

Aunque la utilización de medios de enriquecimiento no/ está siempre recomendada (Gómez-Mampaso, 115), existen situacio-- nes en las que debido a la fuerte contaminación inicial de la - muestra y el bajo número de listerias, es conveniente el enri-- quecimiento de las mismas. Con ese propósito se modificaron -- convenientemente los medios de recogida a fin de hacerlos lo su-- ficientemente selectivos para permitir el crecimiento de las -- listerias y a la vez inhibir el de los gérmenes acompañantes.

Como medios de enriquecimiento seleccionamos medios -- muy ricos en sustancias nutritivas y al mismo tiempo muy selec-- tivos, con las siguientes composiciones:

Medio A:

Peptona (Difco) ----- 5 g

Neopeptona (Difco) -----	5 g
Extracto de carne Lab. Lenco (Oxoid) -	10 g
Extracto de levadura (Difco) -----	5 g
Glucosa (Merck) -----	5 g
Cloruro sódico -----	50 g
Fosfato disódico dihidrato -----	53,22 g
Fosfato monopotásico anhidro -----	1,35 g
Polimixina B (Sigma) -----	8.10 <sup>5</sup> UI
Acido nalidíxico (Serva) -----	50 mg
Tripán azul (Serva) -----	80 mg
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,2-7,5

Para su preparación se disuelve la peptona, neopeptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa en 500 ml de agua destilada; en los 500 ml restantes disolvemos el cloruro sódico y los fosfatos, esterilizando ambos a 116°C durante 15 minutos. Después se mezclan las dos fracciones en condiciones asépticas. Añadimos 12,5 ml de una solución de ácido nalidíxico al 0,4%, 8,0 ml de una solución de polimixina B de - - - 100.000 unidades por ml y 20 ml de una solución de tripán azul/ (Serva) al 0,4% y con una sistemática de preparación que describiremos a continuación.

Se comprueba el pH y en caso necesario se ajusta con las soluciones de fosfato disódico y monopotásico, posteriormente descritas, distribuyéndolo en recipientes estériles a razón/ de 10 ml, almacenándolos a 4°C hasta su utilización.

#### Medio B:

Peptona (Difco) -----	5 g
Neopeptona (Difco) -----	5 g
Extracto de carne Lab-Lemco (Oxoid) --	10 g

Ramposa (Serva) -----	2 g
Cloruro sódico -----	50 g
Fosfato disódico dihidrato -----	53,22 g
Fosfato monopotásico anhidro -----	1,35 g
Acido nalidíxico (Serva) -----	50 mg
Tripán azul (Serva) -----	80 mg
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,2-7,5

Para su preparación se siguen las mismas operaciones -  
que para el medio anterior.

Medio C:

Proteosa nº3 (Difco) -----	5 g
Triptosa (Difco) -----	5 g
Esculina (Merck) -----	1 g
Citrato de hierro amoniacal -----	1 g
Extracto de levadura (Difco) -----	5 g
Extracto de carne Lab-Lemco (Oxoid) -----	5 g
Fosfato disódico dihidrato -----	24 g
Fosfato monopotásico anhidro -----	1,35 g
Cloruro sódico -----	20 g
Acido nalidíxico (Serva) -----	30 mg
Tripán azul (Serva) -----	40 mg
Agar -----	3 g
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,2-7,5

Para su preparación se coloca en un matraz la proteosa, triptona, esculina y citrato férrico disueltos en 500 ml de - -  
agua destilada procediendo del mismo modo que para el medio C -  
de recogida.

En otro matraz, colocamos la levadura, extracto de carne y agar con 250 ml de agua, añadiendo en un tercer matraz el/ cloruro sódico, fosfato disódico y monopotásico disueltos en el agua restante. Esterilizamos los tres matraces a temperaturas/ de 116°C durante 15 minutos. Posteriormente a 50°C se mezclan/ los componentes, comprobando el pH que debe de estar ajustado,/ de no ser así se ajusta con la soluciones fosfato posteriormen- te descritas. Añadimos las cantidades necesarias de las solu-- ciones de tripán azul y ácido nalidíxico, de la forma ya descri<sup>ta</sup>, y distribuimos con el medio aún caliente, en contenedores - estériles de 60 ml de capacidad a razón de 20 ml.

Después de distribuir el medio, y cuando todavía está/ en forma líquida, se introdujo un tubo de vidrio estéril, abier<sup>to</sup> por los dos extremos y de una longitud tal que la superficie del medio, una vez solidificado, permaneciera 2 cm por debajo de/ la abertura de la varilla, según la técnica de movilidad selec- tiva para Salmonellas de Harvey y Price 1.976 (citado por Harri<sup>gan</sup> y McCance, 141).

Es preciso matizar que estos medios al ser ricos en sales, durante su almacenamiento a 4°C, se puede producir un pre- cipitado al disminuir su solubilidad a dicha temperatura, sien- do necesario calentarlos antes de su utilización para redisol-- ver las sales. Para ello basta mantenerlos en la estufa a 37°C hasta su completa disolución, guardando, eso sí, la precaución/ de un cierre hermético a fin de evitar la evaporación y concen- tración de los componentes activos en la fase acuosa.

Para sembrar el medio, con una pipeta Pasteur estéril, depositábamos unas gotas del inóculo en el tubo de vidrio, que- dando éstas sobre la capa del agar y difundándose los gérmenes móvil que pudieran multiplicarse en este medio, a través del tu<sup>bo</sup> al resto del contenedor. Los aislamientos se practicaban de

uno a dos centímetros por debajo de la superficie del medio, - en el exterior del tubo de vidrio, zona en la que observábamos/ el máximo crecimiento (esquema nº 1).

#### IV.5.3. Soluciones de sustancias inhibidoras y tampones

Al comprobar la disolución imperfecta de las sustancias inhibidoras cuando se añadían directamente a los medios de cultivo, decidimos preparar soluciones previas de las distintas sustancias en las condiciones que exponemos a continuación, a fin de lograr una perfecta disolución y homogenización de las mismas.

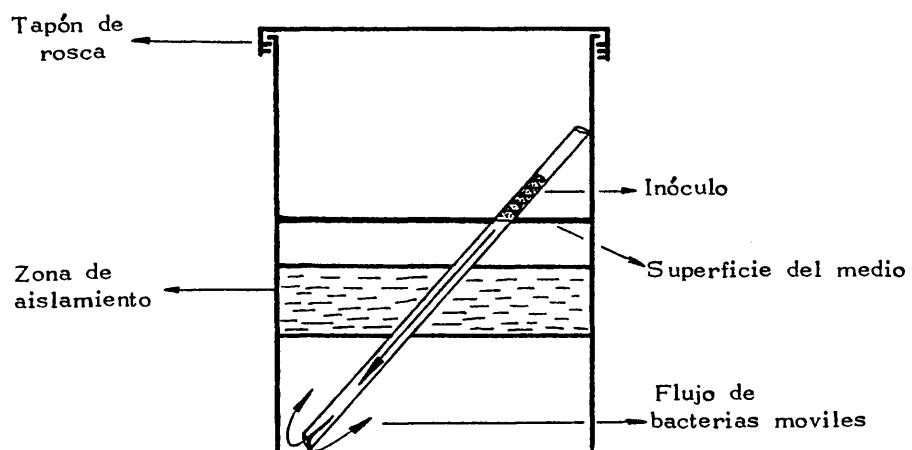
**Solución de Acido Nalidixico:** Disolvimos 0,4 g de ácido nalidixico (Serva) en 100 ml de agua destilada, siendo necesario añadir unas gotas de hidróxido sódico 1 normal, con agitación constante para lograr la perfecta disolución de esta sustancia.

A partir de esta solución que la conservamos en nevera por algún tiempo y que contenía 4 mg por ml de ácido nalidixico, añadíamos la cantidad necesaria de esta sustancia a los distintos medios.

**Solución de Acriflavina:** Preparamos una solución al 0,1% de clorhidrato de acriflavina (Serva), disolviéndola simplemente por agitación y conservándola en nevera a 4°C por algún tiempo. Añadimos la cantidad necesaria de esta solución, que tenía una riqueza en acriflavina de 1 mg por ml a los distintos medios.

Estas soluciones una vez preparadas se podían almacenar durante algún tiempo, sin pérdida de eficacia, resultando muy cómoda y fácil su adicción a los distintos medios, pues bastaba con pipetear la cantidad precisa, asegurándonos también la

ESQUEMA Nº-1



Medio de enriquecimiento C.



perfecta homogenización, no siendo necesario además la esterilización de estas soluciones, ya que como observamos no producían ningún tipo de contaminación sobre los medios al añadirlas sin esterilizar.

Polimixina B: Se preparó una solución de una riqueza/ de 100.000 unidades por ml a partir de polimixina B (Sigma) de/ una riqueza de 7.900 UI/mg. La efectividad y potencia de esta/ polimixina se contrastó además con la utilizada por los laboratorios Wellcome como patrón de una riqueza de 7.600 unidades internacionales por ml y que amablemente nos fué proporcionada.

Tripán Azul: Preparamos una solución de tripán azul - (Serva) al 0,4% en agua destilada, que se disuelve perfectamente por agitación y se conserva bien a temperatura ambiente ya - que a las temperaturas de refrigeración precipita la sal.

Soluciones Tampón: Preparamos dos soluciones al 16%,/ una de fosfato disódico dihidratado como alcalinizante y otra - de fosfato monopotásico como acidificante. Se disolvieron en - caliente y cuando fué necesario añadirlas a los medios ya esterilizados, se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Para utilizar las soluciones conviene que estén a unos/ 50°C para lograr una buena disolución, ya que a menores temperaturas pueden precipitar ligeramente debido a su alta concentración

#### IV.5.4. Medios de aislamiento

Comprobada la buena aptitud para el aislamiento de listerias del medio TNSA propuesto por Ralovich (248) y refrendada su utilidad por numerosos autores (Seeliger, Manev, Kampelma- - cher, etc.) se prepararon una serie de medios con esta base descrita, tendentes a mejorar la selectividad del medio original, /

así como a facilitar el proceso de selección de las presumibles colonias de listerias, de entre ellas se eligieron las siguientes modificaciones:

Medio A: En este medio se sustituyó el suero por sangre de carnero desfibrinada y se le tamponó ligeramente con fosfatos disódico y monopotásico. La composición final es la siguiente:

Peptona (Difco) -----	5 g
Neopeptona (Difco) -----	5 g
Extracto de carne Lab-Lemco (Oxoid) -----	7 g
Cloruro sódico -----	5 g
Glucosa -----	1 g
Acido nalidíxico (Serva) -----	40 mg
Acriflavina ClH (Serva) -----	12 mg
Fosfato disódico dihidrato -----	11,83 g
Fosfato monopotásico anhidro -----	1,35 g
Agar -----	15 g
Sangre -----	50 ml
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,2-7,5

Para su preparación, se disuelven todos los componentes a excepción del ácido nalidíxico, acriflavina y sangre en un matraz, se esteriliza a 115°C durante 15 minutos, se deja enfriar en baño maría hasta una temperatura de 45°C y se añaden la sangre, el ácido nalidíxico y la acriflavina en las condiciones ya descritas para otros medios y en la cantidad necesaria. Se comprueba el pH rectificándolo en caso necesario con fosfatos y se distribuye en placas de Petri a razón de 20 ml almacenándolo a 4°C hasta su utilización.

Medio B: Prácticamente tiene una composición parecida

al anterior, salvo en que se ha aumentado la concentración salina y que se le añade polimixina B a fin de incrementar su selectividad sobre la flora gramnegativa. Su composición es la siguiente:

Peptona (Difco) -----	5 g
Neopeptona (Difco) -----	5 g
Extracto de carne Lab-Lemco (Oxoid) -----	10 g
Glucosa -----	5 g
Extracto de levadura (Difco) -----	5 g
Cloruro sódico -----	40 g
Fosfato disódico dihidrato -----	51,83 g
Fosfato monopotásico anhidro -----	1,35 g
Acido nalidíxico (Serva) -----	40 mg
Acriflavina ClH (Serva) -----	18,7 mg
Polimixina B (Sigma) -----	30.000 UI
Agar -----	15 g
Sangre -----	50 ml
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,2-7,5

Para su preparación, se colocan en un matraz todos los componentes nutritivos del medio disueltos en 500 ml de agua -- destilada y en otro disolvemos las sales y el agar, esterilizando a la temperatura habitual. Después se mezcla el contenido -- de los dos matraces, dejando enfriar hasta 45°C, para añadir la sangre, el ácido nalidíxico, la acriflavina y la polimixina, en la forma ya descrita. Finalmente, se comprueba el pH ajustándo lo si es necesario y distribuyéndolo, por último, en placas de/ Petri.

Medio C: Este medio se confeccionó con la misma base/ que los anteriores, pero se le añadió un azúcar fácilmente uti- lizable por las listerias, la esculina, y un indicador de la --

utilización del referido azúcar. Su composición es la siguiente:

Proteosa nº 3 (Difco) -----	3 g
Peptona (Difco) -----	3 g
Neopeptona (Difco) -----	5 g
Cloruro sódico -----	5 g
Citrato de hierro amoniacal -----	1 g
Esculina (Merck) -----	1 g
Acido nalidíxico (Serva) -----	40 mg
Acriflavina ClH (Serva) -----	12 mg
Fosfato disódico dihidrato -----	12 g
Agar -----	15 g
Sangre -----	50 ml
Agua destilada -----	1000 ml
pH -----	7,2-7,5

Para su preparación se sigue la misma sistemática que/ para los medios ya descritos que contenían esculina y citrato - férrico, se añade la sangre, acriflavina y ácido nalidíxico - - cuando el medio está a 45°C, distribuyéndolo en placas de Petri en la forma ya descrita para los medios A y B.

#### IV.5.5. Otros medios empleados

También y durante la primera y segunda etapa, en que - todavía no teníamos desarrollada totalmente nuestra metodología, y en la tercer como contraste, se utilizaron medios de recogida, enriquecimiento y aislamiento clásicos en la bibliografía. Así, utilizamos como medios de recogida durante la primera etapa los siguientes:

Agua de peptona ramnosa.- Descrito por Despierrez (71), con la composición siguiente:

Peptona (Difco) -----	10 g
Ramosa -----	1 g
Cloruro sódico -----	5 g
pH -----	7,3

Se disolvieron los ingredientes y se ajustó el pH, distribuyéndose en tubos a razón de 10 ml. Se esterilizó en autoclave a 110°C durante 15 minutos.

Caldo triptosa fosfato.- Descrito por Gómez-Mampaso -- (115). Para preparar este medio utilizamos el deshidratado de la casa Difco con la siguiente composición:

Triptosa -----	20 g
Glucosa -----	2 g
Cloruro sódico -----	5 g
Fosfato disódico -----	2,5 g
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,5

Para rehidratarlo disolvimos 29,5 g en 1 l de agua. Se ajustó el pH y se distribuyó en tubos a razón de 10 ml, esterilizándose en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo triptosa fosfato ácido nalidíxico.- Este medio/ se preparó añadiéndole al anterior 10 ml de una dilución al -- 0,4% de ácido nalidíxico en agua destilada, y entubando posteriormente de forma aséptica en tubos estériles a razón de 10 ml, almacenándolos en nevera a 4°C hasta su uso, tras comprobar su esterilidad.

Agua de peptona ramosa ácido nalidíxico polimixina B/ azul de metileno.- Propuesto por Despierrez (71) como medio de enriquecimiento con la siguiente composición:

Peptona (Difco) -----	10 g
Ramosa -----	1 g
Cloruro sódico -----	5 g

Acido nalidíxico (Serva) -----	40 mg
Polimixina B (Sigma) -----	3 mg
Azul de metileno -----	20 mg
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,3

Se disolvieron todos los ingredientes excepto el ácido nalidíxico y la polimixina en 1.000 ml de agua destilada. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos y una vez frío se añadió el ácido nalidíxico y la polimixina, distribuyéndolo asépticamente en tubos estériles a razón de 10 ml, almacenándolos a 4°C hasta su uso, tras comprobar su esterilidad y la reoxidación del azul de metileno.

Agar sangre ácido nalidíxico.- Recomendado por Beerens en 1.966 (19). Para preparar este medio, se utilizó la base de agar nalidíxico comercializada por el Instituto Pasteur.

Para su preparación y siguiendo las instrucciones del fabricante, disolvimos 40 g de medio deshidratado por litro de agua destilada, ajustamos el pH a 7,2 y esterilizamos a 120°C durante 15 minutos, dejando enfriar hasta 50°C, y añadiendo la sangre de carnero en una proporción del 7,5%. Se distribuyó a continuación en placas de Petri estériles a razón de 20 ml por placa.

Agar telurito potásico ácido nalidíxico.- Recomendado por Khan (181). Utilizamos como medio base el agar nutritivo de Oxoid que tiene la siguiente composición:

Extracto de carne Lab-Lemco -----	1 g
Extracto de levadura -----	2 g
Peptona -----	5 g
Cloruro sódico -----	5 g
Agar nº 3 -----	15 g
Agua destilada -----	1.000 ml

pH ----- 7,3

Para su preparación disolvimos 28 g del medio base en/ 900 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7,3 y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, dejando enfriar hasta 50°C. Una -- vez a esta temperatura se le añadieron 100 ml de una solución - de telurito potásico al 0,5% y ácido nalidíxico al 0,04% respec- tivamente, para alcanzar unas concentraciones finales de estas/ sustancias del 0,05% y 0,004%. Una vez homogenizado se distri- buyó en placas para su posterior uso.

Agar ramosa ácido nalidíxico polimixina B: Propuesto por Despierres (71). Como medio base utilizamos la infusión de cerebro y corazón que comercializa la casa Difco con la siguien- te composición:

Infusión de cerebro de ternera -----	200 g
Infusión de corazón de buey -----	250 g
Proteosa -----	10 g
Glucosa -----	2 g
Cloruro sódico -----	5 g
Fosfato disódico -----	2,5 g
Agua destilada -----	1.000 ml
pH -----	7,3

Para preparar el medio, suspendimos 37 g del medio des- hidratado más 1 g de ramosa y 15 g de agar bacteriológico nº 1 (Oxoid) por litro de agua destilada. Una vez diluidos los com- ponentes se ajustó el pH a 7,3 esterilizando a 115°C durante 15 minutos. Dejamos enfriar, y cuando el medio alcanzó una tempe- ratura de 50°C se añadieron 10 ml de una solución de ácido nali- díxico al 0,4% y polimixina B al 0,03%, para alcanzar una con- centración final de 40 mg/l y 3 mg/l respectivamente. Una vez/ homogenizada la mezcla, distribuimos en placas de Petri a razón de 20 ml, almacenándolas a 4°C hasta su utilización.

Durante la segunda etapa, empleamos únicamente como medio de recogida el Agua de peptona rammosa cloruro sódico (Despierrez, 71) como medio de enriquecimiento el Agua de peptona rammosa ácido nalidíxico polimixina B azul de metileno (Despierrez, 71).

Como medios de aislamiento se utilizaron así mismo el/ Agar sangre ácido nalidíxico (Beerens, 19) ya descrito, y Agar/ suero ácido nalidíxico tripaflavina (Ralovich, 248) que describiremos a continuación:

Para preparar este medio utilizamos como base la infusión de cerebro y corazón de la casa Difco anteriormente expuesta. Diluimos 37 g del medio deshidratado y 15 g de agar bacteriológico Oxoid nº 1 por litro de agua destilada. Se ajustó el pH a 7,3 y esterilizamos a 121°C durante 15 minutos dejando enfriar a 50°C y añadiendo 10 ml de una solución de ácido nalidíxico al 0,4%, 10 ml de una solución de tripaflavina al 0,5% (ambas esterilizadas por filtración) y 50 ml de suero de caballo estéril, para alcanzar unas concentraciones finales de 0,04%, - 0,05% y 5% respectivamente. Una vez homogenizada la mezcla se distribuía en placas de Petri a razón de 20 ml por placa, almacenándolas hasta su utilización a 4°C.



#### IV.6. COMPROBACION DE LA SELECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Con el fin de verificar la selectividad de los medios/ por nosotros ensayados para el enriquecimiento y aislamiento de microorganismos del género Listeria, se sembraron en ellos gérmenes de diversos géneros y especies procedentes de la colección de cultivos del Departamento.

En los medios sólidos por el sistema de estría continuada, con flameado intermedio, y en los líquidos mediante suspensión con el asa de platino, en cualquier caso las siembras se incubaron a 22°C durante 10 días.

Para comprobar la presencia de crecimiento, se realizaron resiembras de los medios líquidos a Agar sangre o bien se consideró la aparición de colonias en alguna de las estrías del medio sólido. Las cepas probadas en estas determinaciones fueron las siguientes:

- Alcalígenes faecalis 1
- Alcalígenes faecalis 2
- Bacillus cereus FX87
- Bacillus cereus T16/5
- Bacillus cereus X38/5
- Bacillus cereus T35F
- Bacillus cereus 1
- Bacillus cereus 2
- Bacillus circulans 1
- Bacillus circulans 2
- Bacillus megaterium CCB24
- Bacillus megaterium 1
- Bacillus subtilis CCB19
- Bacillus subtilis 1
- Corynebacterium agropyri M27

Enterobacter cloacae  
Escherichia coli  
Klebsiella pneumoniae  
Micrococcus luteus  
Moraxella nonliquefaciens  
Moraxella sp.  
Proteus rettgeri  
Proteus vulgaris 1.  
Proteus vulgaris 2  
Proteus vulgaris 3  
Pseudomona aeruginosa CCB47  
Pseudomona fluorescens 1  
Pseudomona fluorescens 2  
Salmonella typhimurium  
Serratia marcescens 1  
Serratia marcescens 2  
Serratia marcescens 3  
Shigella dysenteriae  
Shigella sp.  
Staphylococcus aureus CCB34  
Staphylococcus aureus 1  
Staphylococcus aureus 2  
Streptococcus faecium CCB19

Se comprobaron así mismo, las distintas concentraciones de ácido nalidíxico, acriflavina, polimixina B y tripán azul capaces de soportar el crecimiento de las distintas cepas patrón/ de L. monocytógenes en nuestro poder, con el fin de poner a punto nuestra técnica de aislamiento de microorganismos del género Listeria.

#### IV.7. ESTUDIOS DE RESISTENCIA

- Reducción del 2, 3, 5, cloruro de trifeniltetrazolio y resistencia a la azida de sodio: Ambas pruebas se realizan - sobre el mismo medio de cultivo, basado en el que confeccionaron Slanetz y Bartley (44b) para enterococos, que tiene la siguiente composición:

Hidrolizado de caseína -----	20 g
Extracto de levadura -----	6,5 g
Glucosa -----	2 g
Fosfato disódico dihidrato -----	4 g
Cloruro de trifeniltetrazolio -----	0,1 g
Agar -----	12 g
Agua destilada -----	1000 ml
pH -----	7,2

El azida de sodio se añadió en cuatro proporciones diferentes a fin de conseguir unas concentraciones finales del/ 0,1, 0,05, 0,025, y 0,01% respectivamente. Para su preparación se disolvieron todos los componentes (a excepción del cloruro/ de trifeniltetrazolio) en 900 ml de agua destilada, llevándose con agitación continua, mediante un agitador magnético, hasta/ la ebullición durante 5 minutos. Se añade el trifeniltetrazo-- lio disuelto en los 100 ml de agua destilada restantes y se le dejó hervir de nuevo. Inmediatamente se enfrió a 45°C, para -- evitar su reducción. Se distribuyó en placas, quedando una vez frío, listo para su utilización.

Se sembró cada cepa en tres estrías sucesivas, con - flameado intermedio del asa de platino, con lo que cada una de ellas queda con menor concentración que la anterior, y tras cul-- tivarse durante 4 días a 22°C, se observó la presencia o no de crecimiento a cada una de las concentraciones de azida de so-- dio y en los casos positivos la aparición de colonias con un -

trabeculado rojo por haber incorporado y reducido el trifenil-tetrazolio incoloro a formazán, que es de color rojo.

- Crecimiento en bilis al 40%: Para comprobar la capacidad de las distintas cepas de Listeria para crecer en medios - que contienen un 40% de bilis, utilizamos el medio recomendado por Cowan y col., (58) de la siguiente composición:

Bacto oxgall (Difco) -----	40 g
Suero estéril -----	50 ml
Peptona (Difco) -----	10 g
Extracto de carne (Oxoid) -----	10 g
Cloruro sódico -----	5 g
Glucosa -----	5 g
Extracto de levadura (Difco) -----	3 g
Agar -----	15 g
Agua destilada -----	1000 ml
pH -----	7,2-7,3

Para su preparación se disuelven todos los componentes (excepto el suero y la bilis) en agua destilada. Se hierve mediante agitación magnética hasta que se disuelve el agar, y una vez disuelto se va añadiendo lentamente a otro matraz -- que contiene la bilis y que también está sometido a agitación. Disuelta la bilis, se esteriliza a 115°C durante 16 minutos, - se enfria 50°C y se añade el suero; se mezcla bien y se distribuye en placas a razón de 20 ml.

La inoculación se hizo también por el sistema de estrías sucesivas con flameado intermedio, incubando a 22°C durante 48 ó 72 horas y observando, una vez que ha transcurrido - este tiempo, la existencia o no de crecimiento.

- Crecimiento en alta concentración de cloruro sódico: Con el fin de verificar la capacidad de crecimiento de las distintas cepas de listeria a diversas concentraciones de cloruro sódico, se utilizó un medio base, en el que se consiguió un fá-

cil y rápido crecimiento y al que se le adicionaba cloruro sódico en concentraciones finales entre el 4 y 10%.

La composición del medio base es la siguiente:

Proteosa nº 3 (Difco)	-----	5 g
Bactotripton (Difco)	-----	5 g
Extracto de carne Lab-Lemco (Oxoid)	---	5 g
Extracto de levadura (Difco)	-----	5 g
Glucosa	-----	5 g
Fosfato bibásico de sodio dihidratado	-	6 g
Agar	-----	15 g
Agua	-----	1000 ml
pH	-----	7,2

Cloruro sódico, cantidad suficiente para obtener -- concentraciones salinas del 10, 9, 8, 7, 6, 5 y 4% respectivamente.

Para su preparación se disolvieron todos los componentes en el agua. Después de esterilizar a 116°C durante 16/ minutos se distribuyó en placas de Petri. La siembra se realizó en tres estrias sucesivas con flameado intermedio, y la incubación a 22°C durante 72 horas en cámara húmeda, para evitar variaciones en la concentración salina al evaporarse el medio.

- Crecimiento en distintas concentraciones de telurito potásico: Para esta prueba utilizamos el mismo medio base/ que para el crecimiento en alta concentración de cloruro sódico, con la particularidad de que se distribuyó en tubos.

Se preparó una dilución al 1% de telurito potásico/ que se esterilizó con un filtro Milipore de 0,22  $\mu$  de diámetro de poro; para su utilización una vez fundido el agar se dejaba enfriar hasta una temperatura de 45°C, alcanzada la cual se le añadía la solución de telurito potásico en cantidades -

suficientes para obtener unas concentraciones finales de - - - 0,1, 0,05 y 0,025% respectivamente, se distribuyó en placas y/ se inoculó por el sistema de tres estrías sucesivas con flameado intermedio. La incubación se realizó a 22°C durante 72 horas anotándose como positivas las cepas que crecieron reduciendo el telurito potásico, y que por tanto aparecían de color -- negro.

=Crecimiento en distintas concentraciones de polimixina B: La resistencia de las distintas cepas de Listeria a crecer en diversas concentraciones de polimixina B fue comprobada en tres medios distintos con el fin de poder añadirla a los medios de cultivo en la concentración adecuada, tal que no inhibiera el crecimiento de las distintas listerias.

Los medios empleados fueron los siguientes:

Agar levadura glucosa lemco con la siguiente composición:

Proteosa nº 3 (Difco)	-----	5 g
Bactotripton (Difco)	-----	5 g
Extracto de carne Lab-Lemco (Oxoid)	----	10 g
Cloruro sódico	-----	5 g
Glucosa	-----	5 g
Extracto de levadura (Difco)	-----	3 g
Agua	-----	1000 ml
pH	-----	7,3

Agar lemco levadura con igual composición que el anterior con la excepción de carecer de glucosa.

- Agar ramnosa lemco levadura: con igual composición - al primero sustituyendo la glucosa por ramnosa. En todos los - casos, para preparar los medios de cultivo se disolvieron los - ingredientes en el agua, se ajustó el pH y se distribuyó en matrices a razón de 100 ml. Una vez esterilizados a 116°C durante 15 minutos, se añadió de una solución de sulfato de polimi-

xina B (Sigma, de 7.900 UI/mg), esterilizada por filtración y/ con una concentración del 5% en peso: 5, 2,5, 1,5, 0,5, 0,2, - 0,1, 0,05, y 0,01 cc a cada uno de los matraces, con el fin de obtener concentraciones finales de polimixina B que oscilaran/ entre 19.750.000 y 39.500 unidades internacionales por litro.

Se homogenizó y se distribuyó en placas a razón de 20 ml, una vez solidificado el medio se sembró por la técnica de estrías sucesivas con flameado intermedio y se incubó a 22°C durante 72 horas, anotando la presencia o ausencia de crecimiento en cada una de las estrías.

#### IV.8. MÉTODOS DE CLASIFICACION E IDENTIFICACION

##### IV.8.1. Esquema general

Cuando obteníamos un crecimiento abundante en los medios de aislamiento procedíamos a la selección e identificación de las presumibles colonias de Listeria.

La sistemática en las tres etapas fue muy parecida y podemos observarla resumida en el cuadro número 7.

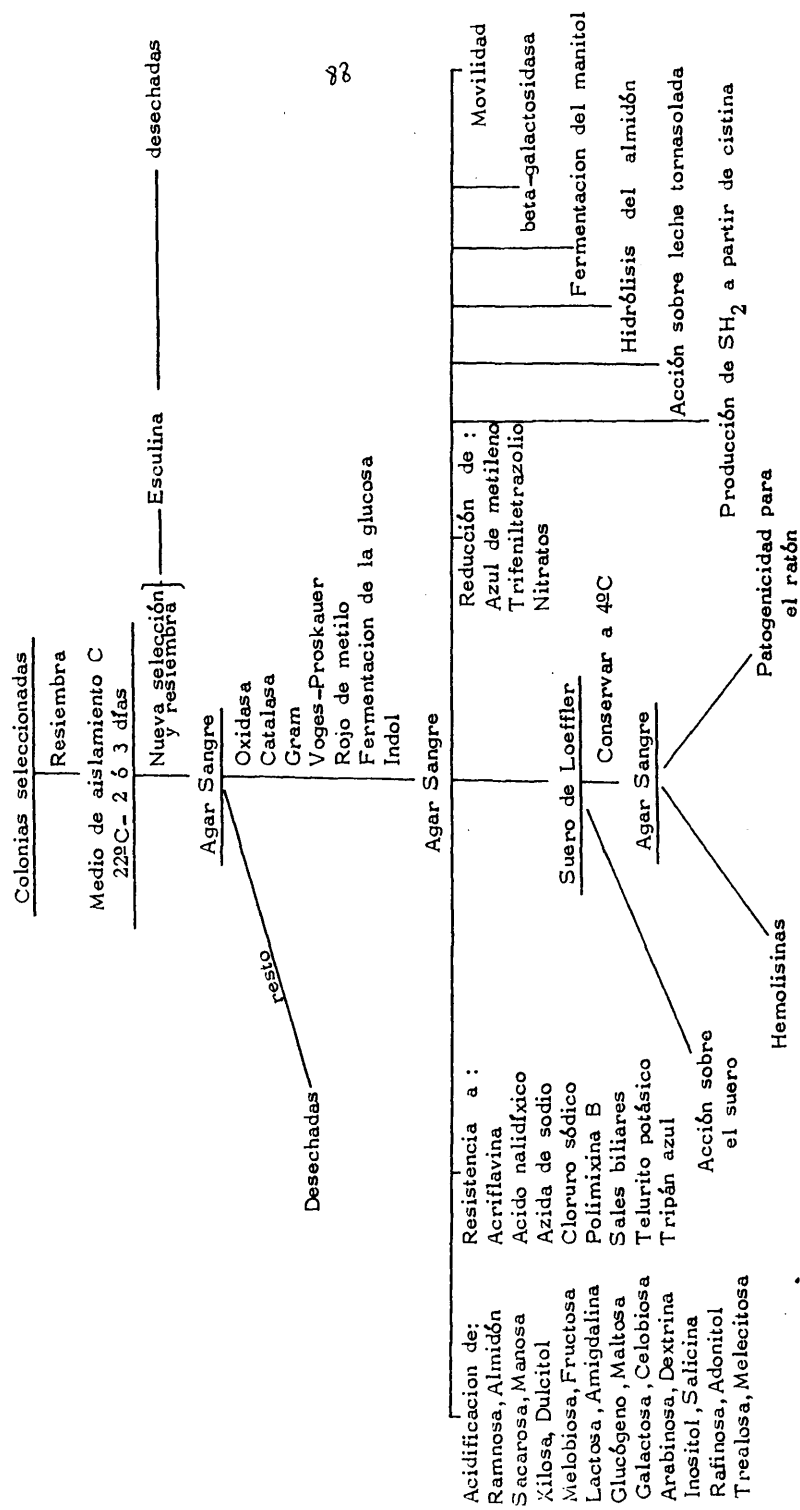
Cuando tras la incubación obteníamos un crecimiento/apreciable, procedíamos a una preselección de las presumibles colonias de listeria por su aspecto morfológico, para lo cual utilizamos una lupa estereoscópica Wild. Mediante la técnica de iluminación oblicua propuesta por Henry (145) y utilizada por numerosos autores Gray (128), Ralovich (250), etc., seleccionamos entre 12 y 50 aumentos aquellas colonias que presumiblemente poseían las características propias de las listerias. Con posterioridad, y al comenzar a utilizar medios que eran opacos tuvimos que emplear luz incidente, en lugar de luz transmitida, modificando para ello ligeramente el sistema de observación. A partir de esta fecha, y a la vista de los resultados, empleamos casi en exclusiva la técnica de luz incidente, aún en los medios que eran transparentes. Unicamente en los casos dudosos, y dado que nuestra instalación era muy versátil, empleamos las dos técnicas.

La morfología de las colonias es un carácter fuertemente influenciado por el medio de aislamiento empleado, sin embargo, a medida que fuimos mejorando su selectividad y capacidad indicadora esta labor fue haciéndose más sencilla y mucho más objetiva.

Las colonias resultantes de esta preselección, fueron sembradas sobre el mismo medio con el fin de obtener cultivos en pureza.



CUADRO Nº7: ESQUEMA GENERAL DE CLASIFICACION E IDENTIFICACION



Una vez confirmada la morfología positiva a listerias, fueron resembradas sobre agar sangre y en el medio de prueba para observar la hidrólisis de la esculina. Este último paso se obvió en el caso de utilizar la técnica puesta a punto por nosotros, ya que sobre el medio C de aislamiento se observaba directamente la hidrólisis de la esculina.

Sobre el agar sangre volvíamos a comprobar el aspecto de las colonias y la pureza del cultivo, realizando a partir de él las pruebas de oxidasa, catalasa, gram, Voges-Proskauer, rojo de metilo, fermentación de la glucosa e indol como pruebas confirmativas.

Cuando esta batería de pruebas resultaba positiva - continuábamos con la identificación, rechazándolas en caso negativo. Al mismo tiempo y mientras obteníamos la confirmación/bioquímica de las distintas cepas, se resembraban en el medio/ de Loeffler, en tubos de tapón de rosca, para observar si ejercían alguna acción sobre el suero, y para una vez crecidas poderlas almacenar a 4°C sobre este medio a fin de conservarlas.

Con posterioridad se volvían a resembrar sobre agar/sangre para investigar la patogenicidad para el ratón de las/distintas cepas y para observar la producción de hemolisinas.

#### IV.8.2. Medios y pruebas utilizados

Producción de acetoina y prueba del rojo de metilo:- Las pruebas de Voges-Proskauer y rojo de metilo se realizaron/ sobre caldo levadura glucosa lemco, según la técnica de Buchanan y col., descrita en el manual de Harrigan y col. (141) .- este medio se utilizó también siempre que se necesitó hacer -- cultivos en medio líquido, por ser un medio muy rico en el que crecen abundante y rápidamente todas las listerias. Su composición es la siguiente:

Peptona -----	10 g
Extracto de carne Lab-Lemco (Oxoid)	10 g
Cloruro sódico -----	5 g
Glucosa -----	5 g
Extracto de levadura -----	3 g
Agua destilada -----	1000 ml
pH -----	7,2-7,3

Se disolvieron los componentes, ajustándose el pH y/ distribuyéndose en tubos a razón de 5 ml, se esterilizó en autoclave a 116°C durante 20 minutos, almacenándolo a 4°C hasta su uso.

Para comprobar la producción de acetil metil carbimol, tras la inoculación, se somete a incubación a 22°C durante 7 días, transcurridos los cuales se separa 1 ml con una pipeta y sobre él se añaden 0,5 ml de una solución de alfa-naftol al 6% y 0,5 ml de hidróxido potásico al 16% según la técnica de Barrit, considerando positivos aquellos tubos que desarrollan color rojo antes de 30 minutos.

Según Harrigan y col., (141), sobre los 4 ml restantes del medio realizamos la prueba del rojo de metilo, con una solución al 0,02% de este colorante en etanol del 57%, considerando positivos los tubos en que el medio tomaba un color rojo, signo evidente de que el pH se encontraba con valores infe

riores a 4,5.

Producción de ácido a partir de carbohidratos: El me dio base utilizado para la acidificación y fermentación de azú cares fue el descrito por Evans y col. en 1.980 (94), ligeramente modificado, con la siguiente composición:

Tryptona (Difco) -----	6 g
Proteosa n° 3 (Difco) -----	6 g
Extracto de levadura (Difco) -----	6 g
Extracto de carne Lab-Lenco (Oxoid) -----	6 g
Agua -----	1000 ml
pH -----	7

Se disuelven los ingredientes y se les añade el azú-car en una proporción de 1% y 2 ml/l de una solución acuosa de púrpura de bromocresol al 1% con el fin de obtener una concentración final del 0,002%. Se comprueba el pH ajustándolo en ca so necesario, se distribuye en tubos de 7 mm de diámetro a razón de 3 ml y se esteriliza en autoclave a vapor fluente, 110°C ó 115°C, según los casos (Cuadro n° 8), almacenándolos - hasta su uso a 4°C.

La inoculación se realizó preparando una fuerte suspensión (N° 5 de la escala de McFarland) de la cepa a estudiar y añadiendo 0,05 ml de la misma a cada uno de los tubos.

Para la fermentación de la glucosa se utilizó el mis mo medio, con la salvedad de que los tubos fueron de 5 mm de diámetro interno, y previamente a su inoculación se hirvieron/ durante 15 minutos, enfriándolos rapidamente en agua salada a/ 0°C. Tras su inoculación se añadió una capa de un centímetro - de vaselina estéril, a fin de mantener las condiciones de anae robiosis.

Después de la incubación a 22°C se comprobaron cada/ 24 horas los resultados hasta transcurridos 15 días, anotando/ como positivos aquellos que en cada momento presentaban clara-

CUADRO N°8: TEMPERATURA Y TIEMPO DE ESTERILIZACION DE LOS DISTINTOS CARBOHIDRATOS

CARBOHIDRATOS	METODO DE ESTERILIZACION
Adonitol	110°C 10'
Almidon	115°C 15'
Amigdalina	110°C 10'
Arabinosa	Tindalización
Celobiosa	110°C 10'
Dextrina	110°C 10'
Dulcitol	110°C 10'
Esculina	115°C 15'
Fructosa	Tindalización
Galactosa	110°C 10'
Glucógeno	110°C 10'
Glucosa	110°C 10'
Inositol	110°C 10'
Lactosa	Tindalización
Maltosa	Tindalización
Manitol	110°C 10'
Manosa	110°C 10'
Melecitosa	110°C 10'
Melobiosa	110°C 10'
Rafinosa	110°C 10'
Ramnosa	110°C 10'
Sacarosa	Tindalización
Salicina	110°C 10'
Sorbitol	110°C 10'
Trehalosa	Tindalización
Xilosa	Tindalización

mente un color amarillo.

- Hidrólisis de la esculina: Para comprobar la hidrólisis de la esculina por parte de las listerias, además del medio de aislamiento C en que también se observa, preparamos el descrito por Buttiaux y col., (46) con la siguiente composición:

Peptona -----	10 g
Citrato de hierro amoniacal -----	1 g
Esculina -----	1 g
Agar -----	15 g
Agua destilada -----	1000 ml
p H -----	7,3

Se disuelven los ingredientes en agua a 50°C, se ajusta el pH si es necesario con una solución de sosa, y se calienta en autoclave a 115°C durante 30 minutos para precipitar las sales alcalinotérreas.

Se filtra en caliente y se distribuye en tubos a razón de 10 ml, se esteriliza a 110°C durante 30 minutos, colocándose posteriormente inclinados hasta que se enfrien y se almacenan hasta su uso a 4°C.

El inóculo lo realizamos en estría a partir de las cepas aisladas en los medios de aislamiento y se incuba a 22°C durante 15 días, retirándolos cuando los tubos se ennegrecían, síntoma evidente de que la cepa hidrolizaba la esculina.

- Hidrólisis del almidón: La prueba de la hidrólisis del almidón, la realizamos sobre medio sólido, para lo cual a una placa de Petri que contenía 10 ml de Agar lemco levadura ya solidificado, añadimos otra capa de 10 ml de Agar lemco levadura, que contenía almidón soluble al 0,5%. Una vez solidificado, sembramos una estría de cada cepa hasta un máximo de cuatro por placa y lo llevamos a incubar a 22°C durante 7 días. Al término de la incubación, inundamos las placas con 10 ml de lugol de Gram. Transcurridos unos segundos el almidón presente

en la placa toma un color morado al reaccionar con el Yodo. Las áreas sobre las que se ha producido la hidrólisis aparecen como zonas más claras, anotando como positivas pues, aquellas cepas que presentaban una zona clara alrededor de las estrías, - síntoma evidente de que poseían beta-amilasas. Un color marrón oscuro indica la presencia de alfa-amilasa.

- Movilidad: Tras unos primeros ensayos con un medio semisólido inoculado por picadura, y tras comprobar la subjetividad de los resultados, que a veces se nos producían, decidimos utilizar el mismo medio pero siguiendo la técnica de movilidad selectiva en tubos de Craigie (Collins, 51) con la siguiente composición:

Proteosa nº 3 (Difco) -----	5 g
Triptona (Difco) -----	5 g
Extracto de carne Lab-Lemco (Oxoid) ---	4 g
Cloruro sódico -----	1 g
Glucosa -----	1 g
Fosfato disódico -----	5 g
Agar -----	1,5 g
Agua destilada -----	1000 ml
pH -----	7,2

Se disuelven los componentes y se comprueba el pH, -- ajustándolo en caso necesario, se esteriliza en autoclave a -- 115°C durante 16 minutos y se distribuye en recipientes estériles que tienen en su interior un tubo abierto por los dos extremos, hasta una altura de unos 2 cm por debajo del borde superior del tubo interno. Se almacenan hasta su uso a 4°C.

Su inóculo lo realizamos a partir de agar sangre, para ello con un asa de picadura tomábamos una colonia que inoculamos en el tubo interno, incubando a 22°C durante 20 días. -- Conforme iban apareciendo signos evidentes de crecimiento en el tubo externo los fuimos anotando como positivos.

- Acción sobre la leche tornasolada: Para determinar - la acción de las listerias sobre la leche se utilizó el medio/ bacto litmus milk de Difco, con la siguiente composición:

Leche desnatada	-----	100 g
Tornasol	-----	0,75 g

Para rehidratar el medio se disolvieron 100 g en --- 1000 ml de agua destilada, distribuyendo en tubos a razón de - 10 ml y esterilizando en autoclave a 120°C durante 15 minutos. Almacenando los tubos a 4°C hasta su uso.

El inóculo se realizó con un cultivo joven sobre Agar sangre y la incubación se practicó a 22°C durante 30 días, observando el tiempo transcurrido hasta la acidificación o la -- acidificación y coagulación de la leche que se revelaba por -- una pérdida del color púrpura o por una pérdida del color y -- coagulación en el segundo caso.

- Crecimiento y reducción del azul de metileno al 0,1% en leche: Se preparó este medio para evaluar la posibilidad de crecimiento de las distintas cepas de listerias en una concentración del 0,1% de azul de metileno, en un medio de la si- -- guiente composición:

Leche descremada	-----	100 g
Extracto de levadura	-----	3 g
Azul de metileno	-----	1 g
Agua destilada	-----	1000 ml
pH	-----	7,2

Se añade poco a poco el agua destilada a un matraz - que contiene los distintos ingredientes sometidos a agitación/ mediante un agitador magnético y una vez disuelto, se ajusta - el pH y se distribuye en tubos de 16 por 160 mm a razón de - - 8 ml, esterilizando en autoclave a 115°C durante 16 minutos. - Una vez esterilizado y antes de su uso, se almacena de 24 a 48



horas a 4°C en nevera para permitir la oxidación del azul de metileno que queda reducido en el proceso de esterilización, quedando a partir de este momento apto para ser utilizado.

Se procedió a la inoculación e incubación como en el caso anterior, retirándolos y anotando la fecha del momento -- de la reducción total del azul de metileno.

- Suero de Loeffler: Se utilizó como medio de conservación de las distintas cepas (Gómez Mampaso, 117), así como para observar si existía algún tipo de actividad serolítica. Para su preparación se disolvieron

2,5 g de Triptona  
1,0 g de Extracto de Levadura  
1,0 g de Extracto de carne  
2,5 g de Glucosa

en 250 cc de agua destilada, tras cuya esterilización a 116°C/ durante 15 minutos, se mezclaron asépticamente con 750 ml de suero de caballo estéril.

La mezcla se distribuyó en tubos de tapón de rosca - a razón de 8 ml por tubo y se colocaron en un horno Pasteur en posición inclinada durante 2 horas a 80°C. Una vez coagulado - el suero se almacenan en nevera hasta su uso.

La siembra se realizó por estría y se incubó a 22°C durante 4 ó 5 días. Una vez crecidas las distintas cepas, se observaron con lupa estereoscópica por si existía algún tipo de acción sobre el suero o para observar la presencia de posibles colonias contaminantes; en caso de resultar el cultivo - puro lo almacenábamos en nevera a 4°C para la conservación de las distintas cepas.

- Medio para la reducción de nitratos: Ante la dificultad planteada para comprobar la reducción de nitratos por parte de algunas cepas de listerias en los medios ordinarios, por falta de crecimiento, confeccionamos uno en el que se producía un crecimiento abundante así como una fácil nitrifica--

ción por parte de las cepas reductoras, con la siguiente composición:

Nitrato Potásico	-----	0,2 g
Bactopeptona (Difco)	-----	8 g
Cloruro sódico	-----	5 g
Extracto de carne Lab-Lemco (Oxoid)	-	5 g
Extracto de Levadura (Difco)	-----	3 g
Agua destilada	-----	1000 ml
pH	-----	7,2-7,3

Para su preparación se disolvieron los ingredientes en el agua y una vez ajustado el pH se distribuyen en tubos a razón de 10 ml, esterilizándose a 116°C durante 16 minutos y almacenándolos a 4°C hasta su utilización.

Se inocularon los tubos a partir de un cultivo joven a Agar-Sangre y se incubó a 22°C durante 7 días, transcurridos los cuales, añadimos 1 ml de cada uno de los dos reactivos de Griess-Ilasvay modificados por McLean y col., en 1.966 (citados por Harrigan y col., 141) y que tiene la siguiente composición:

Reactivo 1:

Acido sulfanílico	-----	1 g
Acido acético, 5 N	-----	100 ml

Reactivo 2:

Alfa naftol	-----	1 g
Etanol al 95%	-----	100 ml

La presencia de nitrato se pone de manifiesto por formarse un color rojo en pocos minutos; en los casos negativos añadíamos una pequeña cantidad de polvo de zinc para comprobar la presencia del nitrato en el medio que al reducirse por el zinc nos revelaba el tubo como positivo.

- Producción de indol a partir del triptófano: para evidenciar si existía producción de indol por parte de las cepas a inves-

tigar se utilizó un medio que contenía una triptona al 1% (en la que comprobamos que estaba libre de indol) y cloruro sódico al 0,5% con un pH final de 7,2. Una vez entubado a razón de 10 ml por tubo y esterilizado a 121°C durante 15 minutos, se inocularon e incubaron a 20°C durante 7 días, poniéndose de manifiesto la existencia de Indol mediante la adición de 0,5 ml del reactivo de Kovacs.

- Prueba de la beta-galactosidasa: La producción de este enzima se puso de manifiesto tras añadir un disco de ONPG (Pasteur) a un mililitro de una suspensión densa (tubo nº 5 de la escala de McFarland) de la cepa problema en solución salina al 0,8%. El desarrollo de un color amarillo, debido a la liberación de ortonitrofenol, tras una incubación a 37°C durante 18 horas, fue interpretada como la positivación de la prueba.
- Prueba de la citocromo-oxidasa: Se realizó sobre tiras reactivas de "Pathotec", para lo cual sobre la zona reactiva de la tira se extendían 1 ó 2 colonias con un asa de platino estéril. El desarrollo de un color azul en 30 segundos, debido a la producción de indofenol se consideró como evidencia de la presencia del enzima.
- Prueba de la catalasa: Sobre una gota de peróxido de hidrógeno emulsionamos una colonia de un cultivo joven de la cepa a investigar crecida en un medio libre de azúcares y sin extracto de levadura. La presencia del enzima se evidenció por el burbujeo producido al liberarse el oxígeno.
- Producción de amoníaco a partir de la urea: Para poner de manifiesto si nuestras cepas eran capaces de hidrolizar la urea con producción de amoníaco utilizamos el Agar urea de Christensen (1.946) (citado por Harrigan y col., 141) con la siguiente composición:

Peptona ----- 1 g

Cloruro sódico -----	1 g
Fosfato monopotásico -----	2 g
Glucosa -----	1 g
Rojo fenol al 0,2% en sol acuosa -----	6 ml
Agar -----	20 g
Agua destilada -----	1.000 ml

Disolvimos los ingredientes y los repartimos en tubos/ con tapón de rosca a razón de 9 ml por tubo, esterilizando en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Después de enfriarlos a 50°C en un baño maría añadíamos de forma aséptica 1 ml de una solución de urea al 20%, para obtener una concentración final de urea del 2%.

Los tubos se disponían en posición inclinada, dejándolos enfriar y conservándolos en nevera a 4°C.

Para su utilización se sembraron en estría y se incubaron a 22°C durante 10 días; los casos positivos se evidenciaron por el paso de color amarillo al rojo, al alcalinizarse el medio por el desprendimiento de urea. Con el fin de confirmar el resultado de los positivos, se sembraron nuevamente en el mismo medio sin urea por si el amoniaco producido pudiera provenir de la peptona en lugar de la urea.

- Producción del sulfhídrico a partir de la cistina: Para verificar la producción de sulfhídrico, utilizamos la técnica descrita por Harrigan y col. (141). Para lo cual en el Caldo levadura glucosa lemco, ya descrito para la realización de la prueba del Voges-Proskauer, disolvíamos 0,1 g de cistina por litro de medio, entubando a razón de 5 ml y esterilizando a 116°C durante 20 minutos. En el momento de la siembra colocamos entre el tapon y el tubo, de forma que la parte inferior de la tira no contactara con el medio, una tiras de papel de filtro de 5x0,5 cm previamente impregnadas en una solución saturada de --

acetato de plomo, secadas y esterilizadas en horno Pasteur a - 80°C durante 2 horas. Los tubos fueron incubados junto con un/ testigo a 22°C durante 10 días, anotando como resultados positivos aquellos en que se había ennegrecido el papel en este tiempo, signo evidente de la producción de sulfhídrico. En los tubos negativos añadíamos 0,5 ml de ácido clorhídrico 2N, restituyendo acto seguido el tapón con la tira, para comprobar el desprendimiento del sulfhídrico que hubiera podido quedar disuelto en el medio.

#### IV.9. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA

Ante los resultados que veníamos obteniendo en la detección de hemolisinas aún aplicando la prueba C.A.M.P. (Seeliger, 248), en los que muchos casos se observaba cierto grado de digestión péptica de la sangre que nos hacía muy difícil la interpretación de los resultados, decidimos verificar la potencia hemolítica de cada cepa en micropruebas realizadas en tubo, siguiendo la técnica de Sørensen (298).

Con posterioridad modificamos el método de recogida de hematíes y el tampón sobre el que hacíamos las suspensiones, -- por los utilizados para la técnica de fijación del complemento -- en la Escuela Nacional de Sanidad (10), que nos ofrecieron unas hemólisis mucho más clara. La técnica podemos resumirla en los siguientes pasos:

1.- Recogida de Hematíes: Empleamos hematíes de carnero. La sangre se recogía directamente de la yugular con una jeringa estéril de 10 ml; inmediatamente se mezclaba la sangre recogida con igual cantidad de una solución conservadora Alsever, con la siguiente fórmula:

Glucosa -----	18,66 g
Cloruro sódico -----	4,18 g
Citrato sódico -----	8,00 g
Acido cítrico -----	0,55 g
Agua destilada -----	1.000 ml

Se reparte en frascos pequeños a razón de 10 ml (que-- dando en el frasco suficiente espacio para añadir 10 ml de sangre) y se esteriliza en autoclave a vapor fluente durante 1 hora o bien por filtración.

Una vez mezclada con la sangre de carnero se almacena en nevera donde se conserva hasta 1 mes, no comenzando a usarla

hasta transcurridos 5 días de la recogida. Antes de utilizar-- los hacemos una suspensión de hematíes al 2% en la solución de/ Mayer Croft, que tiene la siguiente composición:

Cloruro sódico -----	85 g
Acido dietil barbitúrico 5,5 -----	5,75 g
Dietil barbiturato sódico 5,5 -----	3,75 g
Cloruro magnésico -----	1,68 g
Cloruro cálcico -----	0,28 g
Agua destilada -----	2.000 ml

Para su preparación ponemos a calentar (sin que hier-- va) 500 ml de agua destilada en un matraz de 2.000 ml y disolve mos el ácido dietilbarbitúrico. Una vez disuelto añadimos el - cloruro sódico y el barbiturato sódico; llevamos el volumen a - 2.000 ml con agua destilada y añadimos el cloruro cálcico y mag nésico. Esterilizamos en autoclave a 121°C durante 20 minutos/ y la dejamos enfriar, el pH estará comprendido entre 7,4 y 7,6. Esta solución se conserva en nevera a 4°C, y para utilizarla, - siempre se diluye al quinto en agua destilada.

2.- Preparación de la suspensión de Hematíes: Para pre parar la suspensión de hematíes tomábamos los 10 ml de sangre - diluidos en 10 cc de solución Alsever y los centrifugamos a 800 r p m durante 20 minutos; retiramos el sobrenadante y lo susti- tuimos por igual cantidad de solución Mayer Croft 1:5; volvemos a centrifugar y repetimos la operación dos veces más. Después/ del último lavado y una vez retirado el sobrenadante, tomamos 2 ml de hematíes y los suspendemos en 100 cc de solución Mayer -- Croft al quinto quedando ya listos para su uso, y pudiendo con- servarse en nevera a 4°C durante 15 ó 20 días.

Para realizar la prueba, en tubos de 10 mm de diámetro, depositamos 0,5 ml de la suspensión de hematíes al 2% y añadi-- mos 0,1 ml de una suspensión de cada una de las cepas en solu--

ción salina al 0,8%, con una opacidad similar al tubo 1 de la -  
escala de McFarlan de sulfato de bario que contenía aproximada-  
mente  $3 \times 10^8$  bacterias por mililitro. Agitamos los tubos tras -  
sellar las bocas con papel de parafina y los colocamos a incu--  
bar a 22°C durante 18 horas, sometiénolos a refrigeración a --  
4°C otras 6 horas más y anotando los resultados de hemólisis to  
tal o parcial tras comparación con los testigos que contenían/  
solamente 0,5 ml de la suspensión de hematíes y 0,1 ml de solu-  
ción salina al 0,8%. También realizamos las pruebas de hemolisi-  
nas suspendiendo los cultivos en una solución de glucosa al 0,5%  
en agua destilada con un 0,6% de cloruro sódico.



#### IV.10. PRUEBAS SEROLOGICAS

Una vez recogida la sangre y remitida al laboratorio, se dejó coagular a temperatura ambiente, introduciéndola después en nevera a 4°C para separar el suero, que una vez recogido se distribuyó en una serie de 9 tubos de Kahn por muestra, procediéndose del modo siguiente:

En el primer tubo se situaron 0,9 ml de tampón fosfato a pH 7,2 y 0,1 ml del suero problema; después de homogenizar perfectamente transferíamos 0,5 ml al segundo tubo que ya contenía 0,5 ml de tampón fosfato al igual que los siguientes, homogenizábamos y repetíamos el proceso hasta el tubo octavo, retirando de éste los 0,5 ml que sobraban. Con posterioridad añadíamos 0,5 ml del antígeno comercial Difco tipos 1 y 4 y homogenizábamos perfectamente, quedando el noveno tubo como testigo, ya que sólo contenía 0,5 ml de tampón fosfato y 0,5 ml de antígeno, pero no suero.

Incubamos a 50°C durante 2 horas en baño maría y posteriormente a 4°C durante una noche en nevera, según las recomendaciones de la casa suministradora del antígeno (73); procediéndose finalmente a su lectura, observando hasta que tubo se había producido la aglutinación por comparación con el testigo -- que sólo tenía sedimentación. Conforme a este esquema de trabajo, obtuvimos resultados con unas diluciones positivas del suero desde 1/20 hasta 1/2560.

#### IV.11. ANTIBIOGRAMAS

La sensibilidad a diversos antibióticos de las cepas - aisladas se estudió mediante la técnica de difusión sobre agar/ de Mueller-Hinton (Difco) al que se le añadió un 5% de sangre/ desfibrinada de carnero.

Las placas Petri de 8 cm de diámetro, se llenaron con/ 20 ml de medio, para que la profundidad del agar fuera aproxima- damente 4 mm.

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de 72 ho- ras en Caldo levadura glucosa lemco, del que se separó 1 ml di- luyéndose en 9 ml del mismo caldo sin inocular; de esta disolu- ción (1/10) se tomaron 3 ml con los que se inundaron las placas, retirando el líquido sobrante después de haberlo puesto en con- tacto con toda la superficie del agar durante unos minutos.

Tras secar las placas a 37°C, durante 15 minutos, se - colocaron los discos de antibióticos (Difco y Pasteur) a razón/ de 5 por placa.

La incubación a 22°C se prolongó por un periodo de 36 horas, transcurridas las cuales, se llevó a cabo la lectura, pa- ra lo cual se midió el diámetro del halo de inhibición con un - compás, que luego aplicamos sobre una regla graduada.

Para calcular la concentración mínima inhibitoria - - (CMI) a que cada antibiótico era eficaz, para las distintas ce- pas, se llevaron los diámetros del halo sobre la curva de regre- sión que para cada antibiótico confeccionamos con los datos su- ministrados por el manual de técnicas de bacteriología de - - - Daguet y Chabbert (66). Para ello representamos en ordenadas - los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros, y en abs- cisas las CMI. Con el fin de conseguir una interpretación más/ rápida representamos las CMI en forma logarítmica, transforman-

do la función exponencial en una ecuación lineal.

Las medidas en milímetros de los halos de inhibición - en los antibiogramas realizados con las distintas cepas, se extrapolaron a la ordenada de la recta, obteniendo en abscisas el logaritmo de la CMI. Hallando el antilogaritmo se obtiene - - directamente la concentración mínima inhibitoria a que cada antibiótico era eficaz.

Probamos 10 antibióticos de los más utilizados en la - clínica práctica para este tipo de procesos por su fácil difusión a los distintos tejidos orgánicos y por su probada efectividad frente a las listerias.

Los antibióticos utilizados, así como la potencia de - los discos empleados y sus concentraciones y diámetros críticos quedan expuestos en el cuadro nº 9.

Debido a los resultados que obtuvimos y por ser de más fácil interpretación y manejo, los logaritmos de la función se han tomado con base dos, con lo que las rectas de regresión para cada antibiótico, quedan como sigue (Figuras del nº 1 al - - nº 10).

CUADRO N°9: ANTIBIOTICOS Y POTENCIA DE DISCOS UTILIZADOS

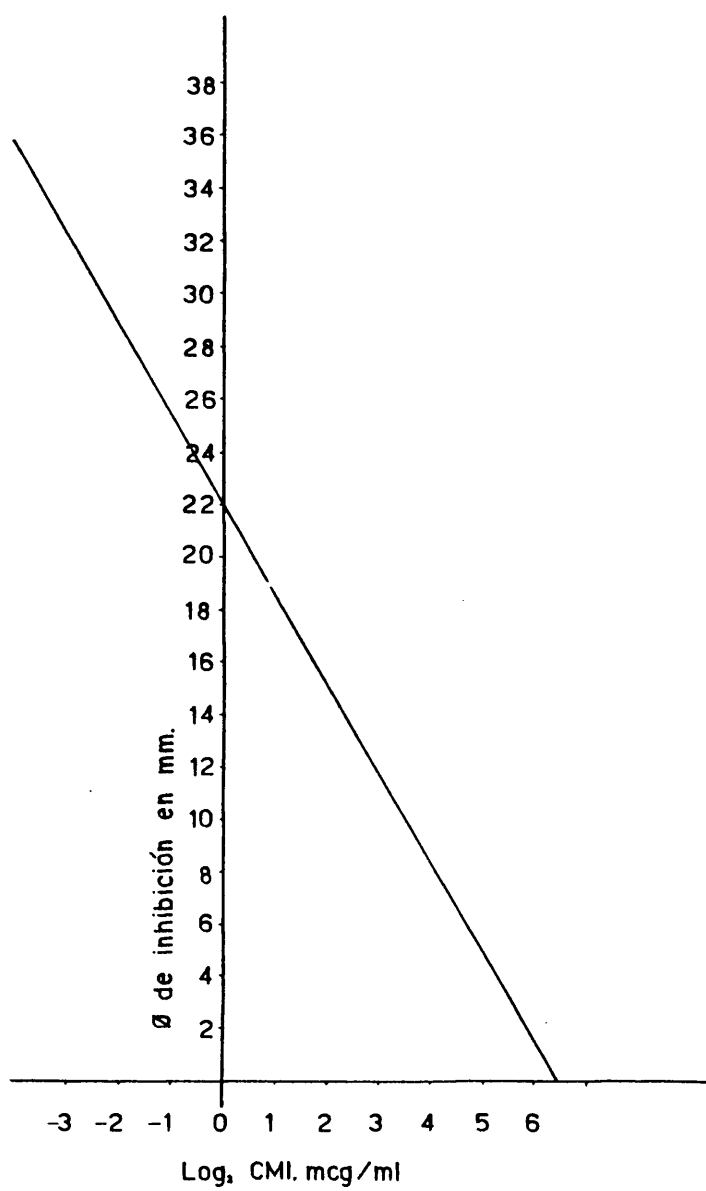
ANTIBIOTICOS	P.	C.C.	D.C.
PENICILINA	10	0'25-16	29-8'5
CEFALOTINA	30	4-32	21-11'5
ESTREPTOMICINA	30	4-64	21-11
KANAMICINA	30	4-64	20-9'5
GENTAMICINA	30	2-16	22'5-15'5
TETRACICLINA	30	2-16	20-12
CLORANFENICOL	30	8-32	23-16
ERITROMICINA	15	1-4	22-17
LINCOMICINA	15	2-8	21-16'5
RIFAMPICINA	30	4-32	19-12

P:Potencia del disco en mcg.

C.C:Concentración crítica en mcg.

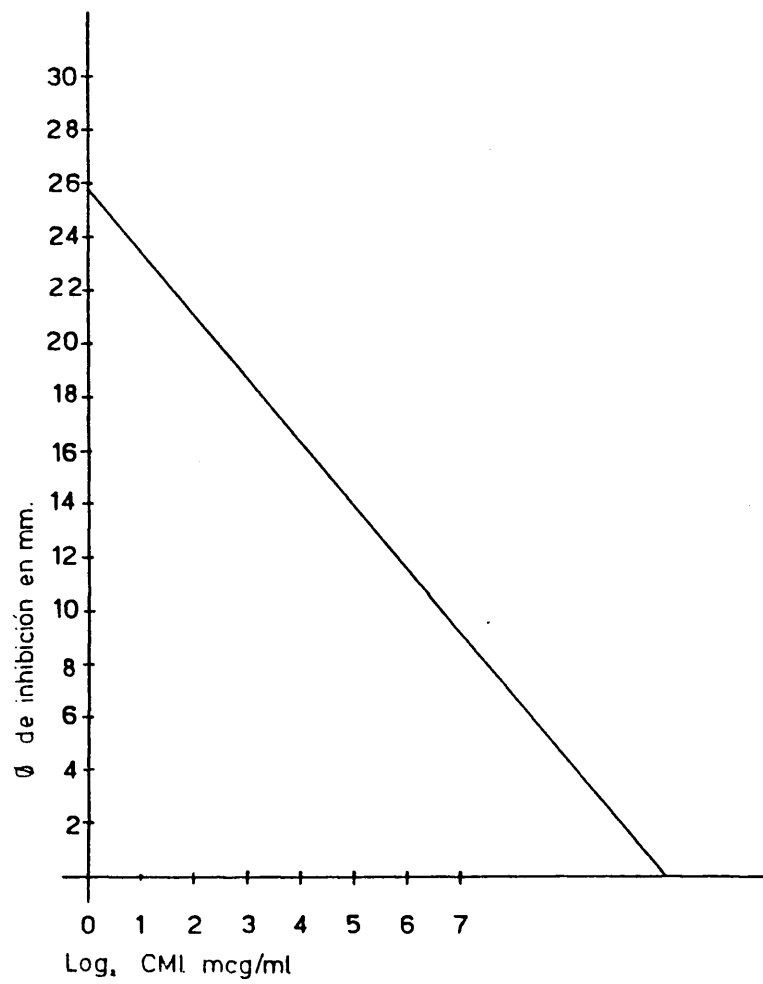
D.C:Diámetro crítico en mm.

FIGURA Nº 1 108



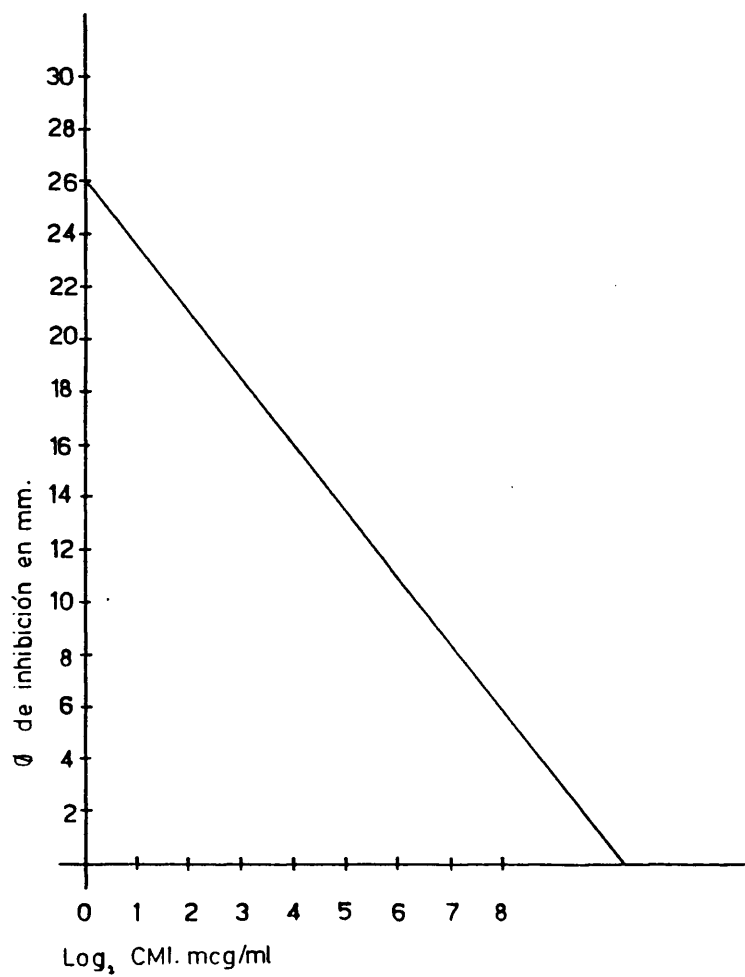
PENICILINA

FIGURA Nº 2 109



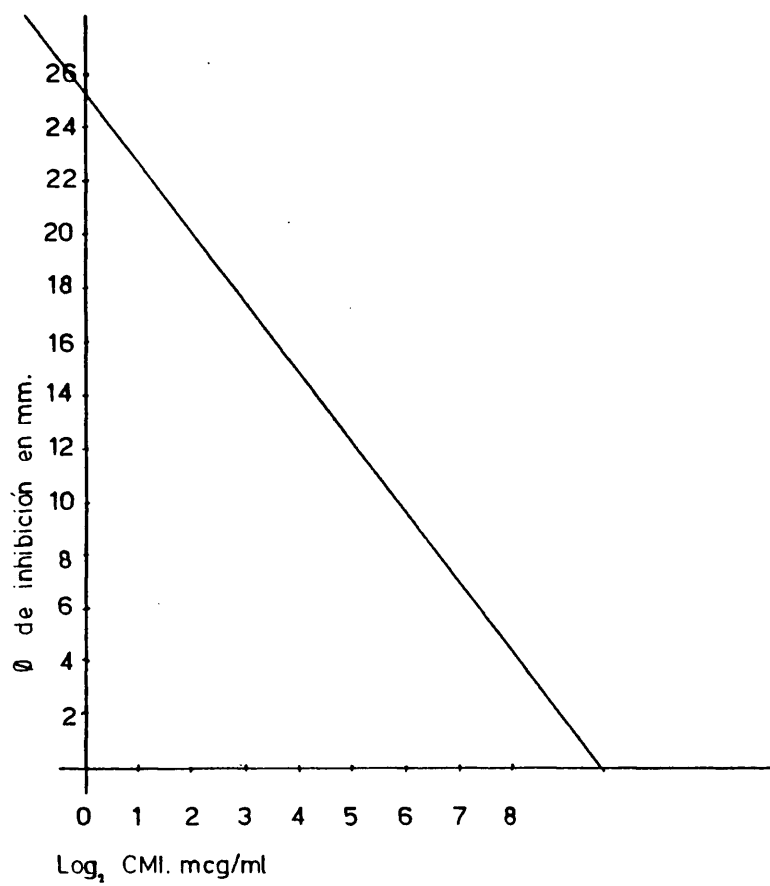
CEFALOTINA

FIGURA Nº 3 110



ESTREPTOMICINA

FIGURA Nº 4



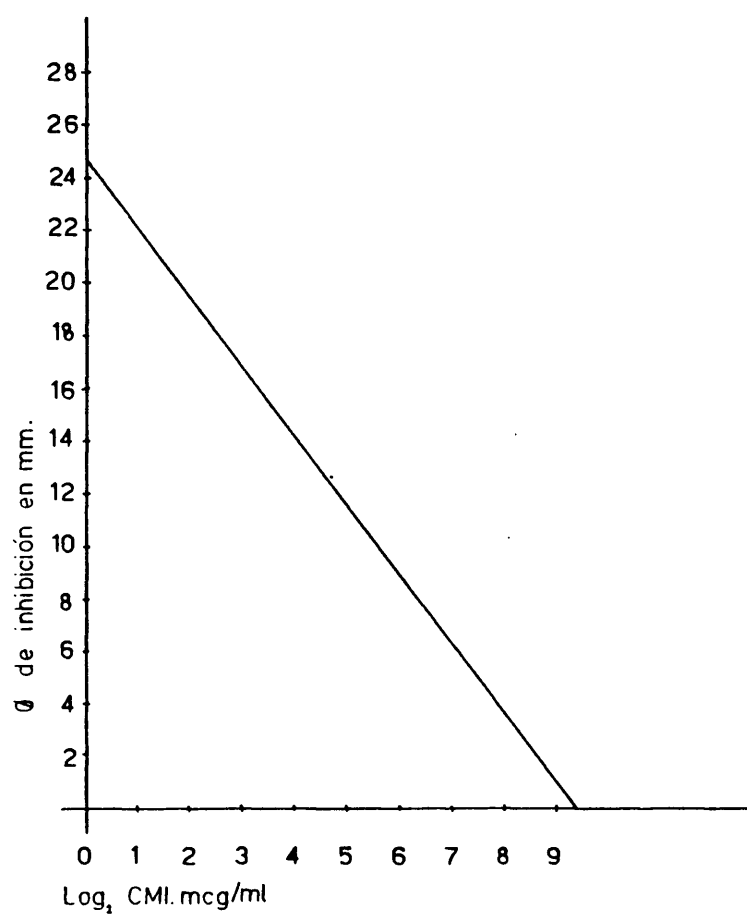
KANAMICINA



BIBLIOTECA

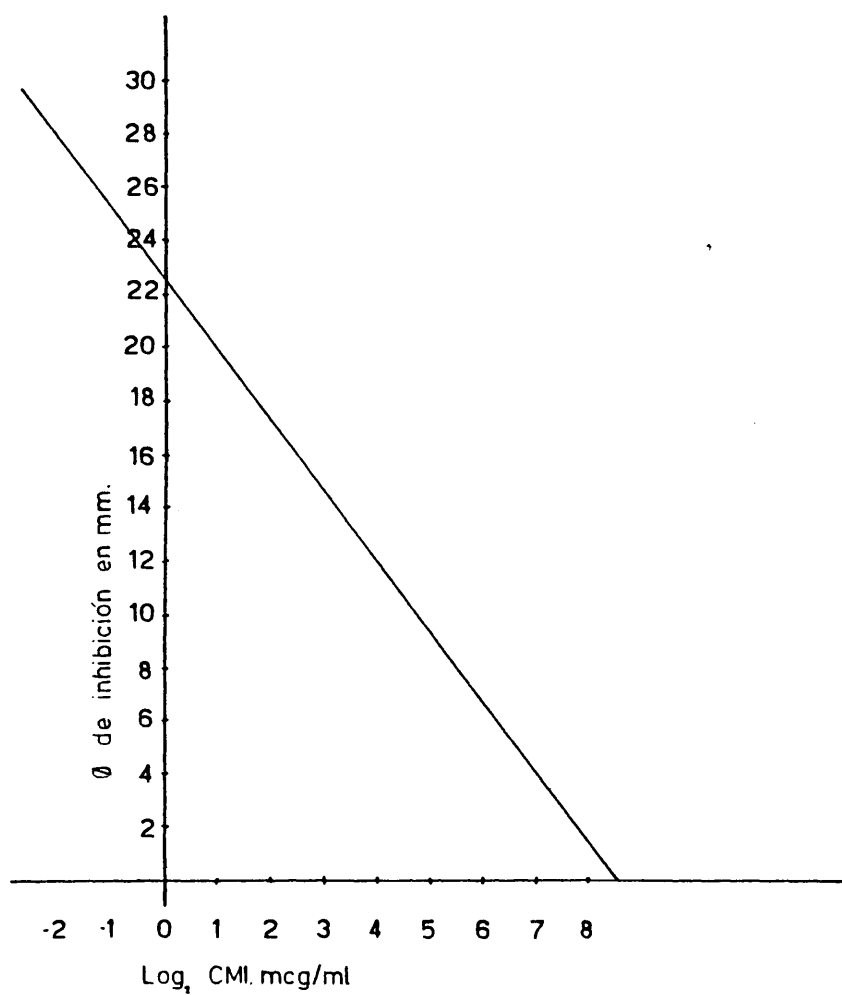


FIGURA Nº 5 112



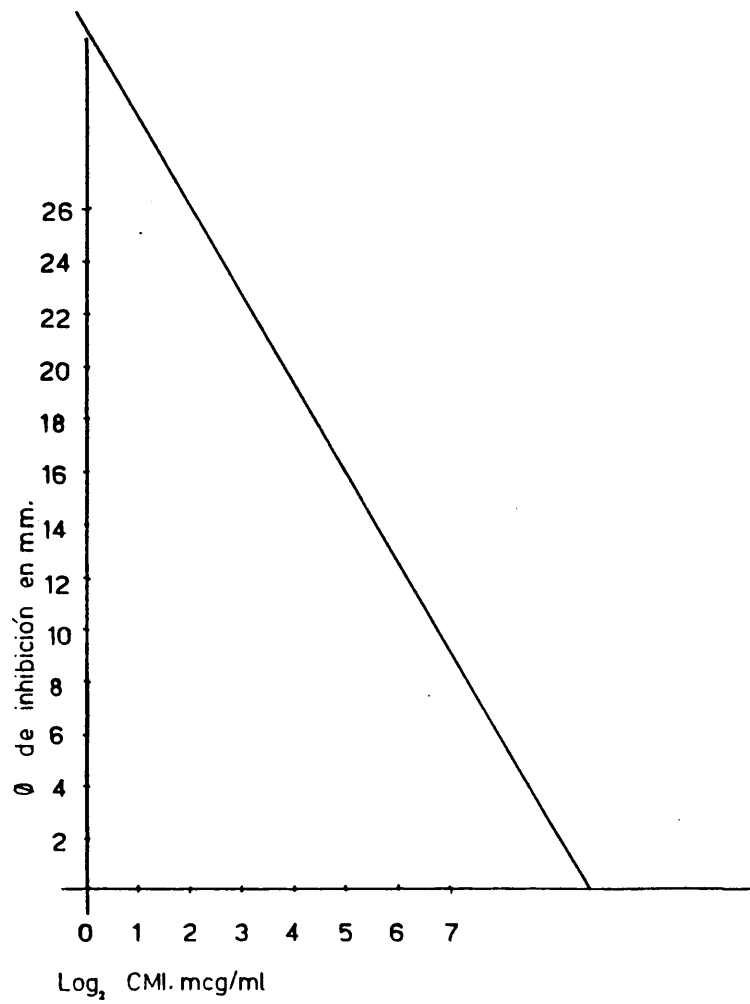
GENTAMICINA

FIGURA Nº 6 113



TETRACICLINA

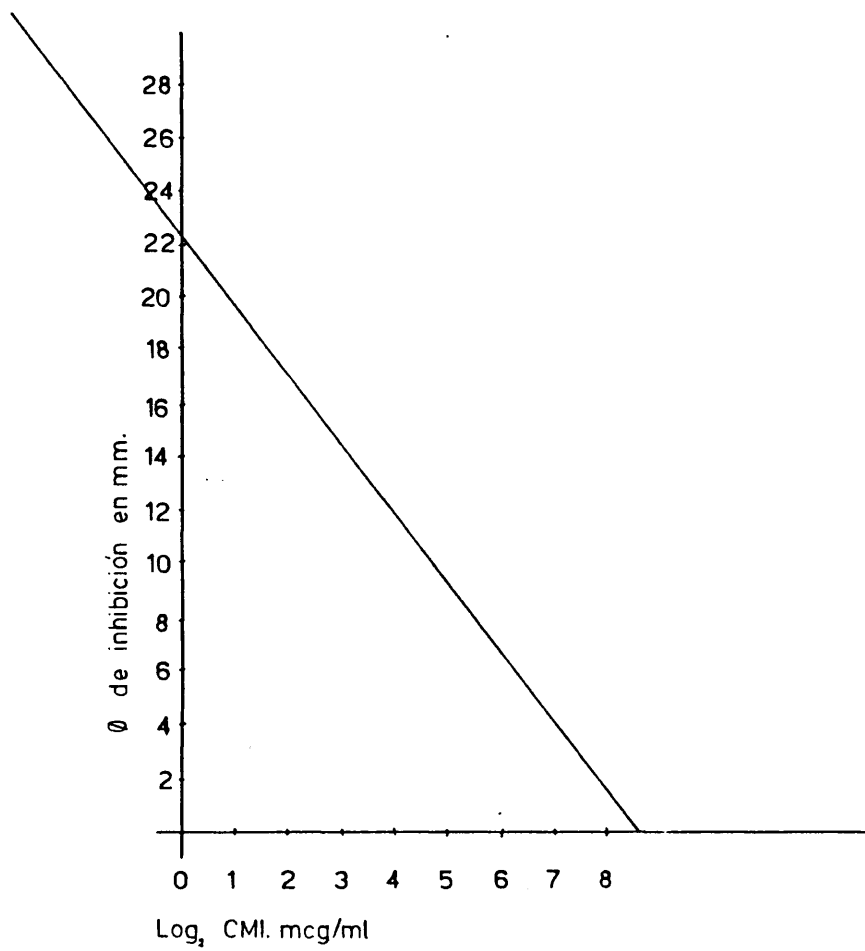
FIGURA Nº7 11h



CLORANFENICOL

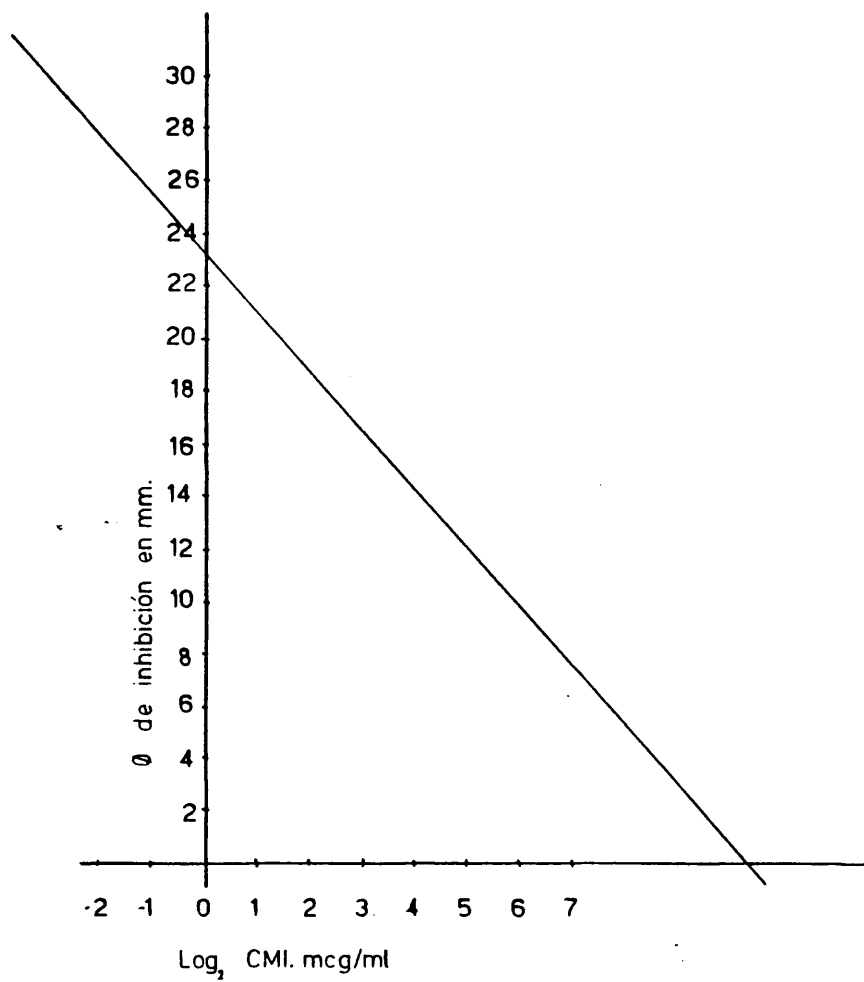
FIGURA Nº 8

115



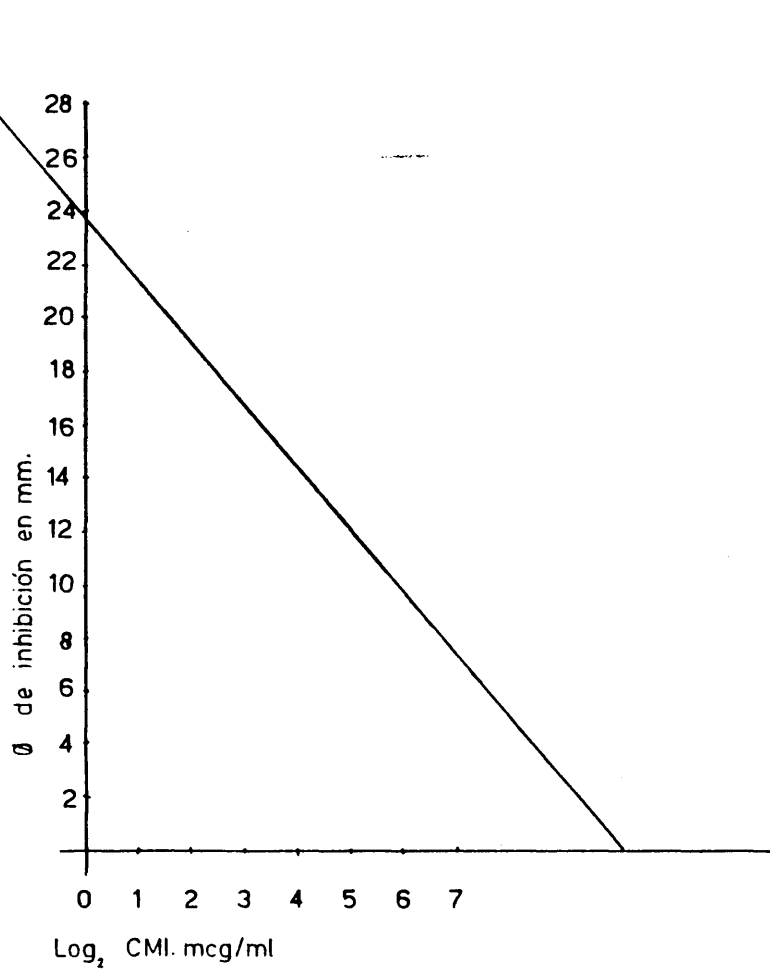
ERITROMICINA

FIGURA Nº 9 116



LINCOMICINA

FIGURA Nº 10 111



RIFAMPICINA

#### IV.12. INOCULACIONES EXPERIMENTALES EN ANIMALES DEL LABORATORIO

Las pruebas de letalidad de las distintas cepas de Listeria se llevaron a cabo en dos etapas.

En la primera de ellas probamos por diversas vías y en varios animales de experimentación distintas cepas standard de L. monocytógenes pertenecientes a varios serotipos suministrados por Seeliger e Ivanov. En una segunda etapa se probaron todas las cepas de Listeria obtenidas en el muestreo, con el fin de observar su patogenicidad sobre el ratón.

Cepas estudiadas en la primera etapa:

Las cepas que se probaron se corresponden con los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, y 7, de las suministradas por Seeliger; y las cepas: 41178 serotipo 1a; la 71778 serotipo 4b, serotipos 5 y 6 de las suministradas por Ivanov, todas ellas aisladas a partir de animales.

Animales de experimentación:

Se utilizaron animales de laboratorio de distintas especies y ambos sexos. Así inoculamos:

Conejos	entre	2,5 y	3 Kg de peso
Cobayas	entre	400 y	500 gr de peso
Cricetos	entre	300 y	350 gr de peso
Ratones	entre	30 y	40 gr de peso

Vías de inoculación:

Se utilizaron con las diversas cepas y especies las -- vías subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, endovenosa, -- subdural, oral y cámara anterior del ojo e instilación conjuntival.

Sistema de inoculación:

De un cultivo de 36 horas a 22°C sobre Agar sangre y -

mediante arrastre con el asa de platino, realizábamos una suspensión de las distintas cepas en una solución estéril de - - - Ringer al cuarto. Después de homogenizar perfectamente la suspensión mediante agitación mecánica, se continuó diluyendo hasta obtener una turbidez aproximada al tubo número 1 de la escala de Mc Farland de sulfato de Bario, lo cual corresponde aproximadamente con  $3.10^8$  bacterias por ml (Gastón, 110).

Inmediatamente se procedió a la inoculación de los distintos animales.

#### Inoculaciones:

Se practicaron sobre lotes de 3 animales para cada vía y cepa, de los que uno se dejó como testigo; caso de aparecer - algún resultado paradójico se repetía la experiencia con lotes/ de 5 animales, quedando uno igualmente como testigo.

Las cantidades inoculadas fueron las siguientes:

#### CONEJO

Vía subcutánea: Se inocularon 5 ml de la suspensión en la zona de la espalda, previamente afeitada y desinfectada con/ una solución alcohólica de yodo.

Vía intraperitoneal: Las inoculaciones se hicieron con 5 ml de la suspensión bacteriana en la región umbilical.

Vía endovenosa: Ingurgitando previamente la vena marginal de la oreja mediante la aplicación de una pinza, inoculamos lentamente 5 ml de la suspensión en una zona previamente rasurada y desinfectada.

Vía intramuscular: Los inóculos se hicieron en la región poplíteica previo rasurado y desinfectado; la cantidad inoculada fué de 5 ml.

Vía subdural: Practicamos primeramente una incisión -- con bisturí en la línea media de la cabeza, 2 cm por encima de/ la línea que une los ojos. Una vez disecada la piel, el tejido subcutáneo y levantado el periostio, con un trépano perforába--



mos el cráneo, instilando lentamente con una jeringa de insulina, 0,1 ml de la suspensión bacteriana a través de la duramadre. Acto seguido se suturaba la piel con seda estéril.

Cámara anterior del ojo: Anestesiamos la zona con xilocaína al 1% y tras sujetar perfectamente el globo ocular, inoculamos, en el borde de la cámara anterior del ojo y con la aguja perpendicular al eje antero-posterior, 0,05 ml de la suspensión bacteriana. Tras la inoculación, se observaba enturbiamiento de la cámara anterior, signo evidente que la inoculación era correcta.

Vía oral: Tras una dieta hídrica de 18 horas, con suministro de comida normal colocamos en los bebederos una suspensión de bacterias en agua destilada con una opacidad similar al tubo 3 de la escala de Mc Farland (aproximadamente  $9.10^8$  bacterias por ml).

Aproximadamente a las 2 horas habían consumido los 25 ml por animal que colocamos en los bebederos, restituyendo a partir de este momento el agua de bebida normal.

#### COBAYAS Y CRICETOS

Se emplearon las mismas vías que en el caso de los conejos, a excepción de la vía endovenosa y la cámara anterior del ojo. La sistemática de inoculación también fue semejante, excepción hecha de las cantidades inoculadas, que fueron exactamente la mitad; así, empleamos 2,5 ml de la suspensión bacteriana en las vías subcutánea, intraperitoneal e intramuscular, - 0,05 ml en la vía subdural y 12 ml en la vía oral.

#### RATONES

Se emplearon las mismas vías y sistemas de inoculación que en los conejos con las diferencias propias derivadas de las diferencias anatómicas de ambas especies. No se utilizó la vía endovenosa ni la inoculación en la cámara anterior del ojo, - practicándose, sin embargo, una instilación conjuntival.

En el caso de la inyección subdural no fué preciso -- practicar la trepanación previa, ya que con la misma jeringa de inoculación, inyectamos directamente 0,02 ml.

Las cantidades inoculadas fueron además de las expuestas, 0,5 ml por las vías subcutánea, intramuscular e intraperitoneal, y 1 ml por vía oral.

Necropsias y aislamientos a partir de los animales inoculados:

A medida que los animales inoculados por las distintas vías iban muriendo, anotamos la fecha y hora de su muerte y -- les practicábamos una necropsia sistemática, accediendo a las -- cavidades de forma aséptica. Para ello, en bandejas o placas adecuadas (según los casos) se sujetó al animal en decúbito supino, afeitando y desinfectando toda la superficie corporal -- con alcohol etílico de 96%, procediendo a la apertura de las -- distintas cavidades, previa disección de la piel.. En primer -- lugar incidíamos la cavidad abdominal, anotando las lesiones y/ tomando muestras de forma aséptica de hígado, bazo, glándulas -- antarrenales, riñón y exudado peritoneal; posteriormente abríamos la cavidad torácica tomando muestras de sangre del ventrículo izquierdo, pulmón (de los focos lesionados) y exudado pleural y por último levantábamos la bóveda craneana observando el estado de las meninges, el encéfalo y tomando muestras de él.

Después de homogeneizar perfectamente las muestras con un rompedor de células manual en el medio de recogida A, procedimos a sembrar sobre Agar levadura glucosa lemco sangre y el -- medio de aislamiento C, incubando a 22°C durante 2 días y dejando un resto a 4°C para evitar la pérdida de la muestra en caso/ negativo.

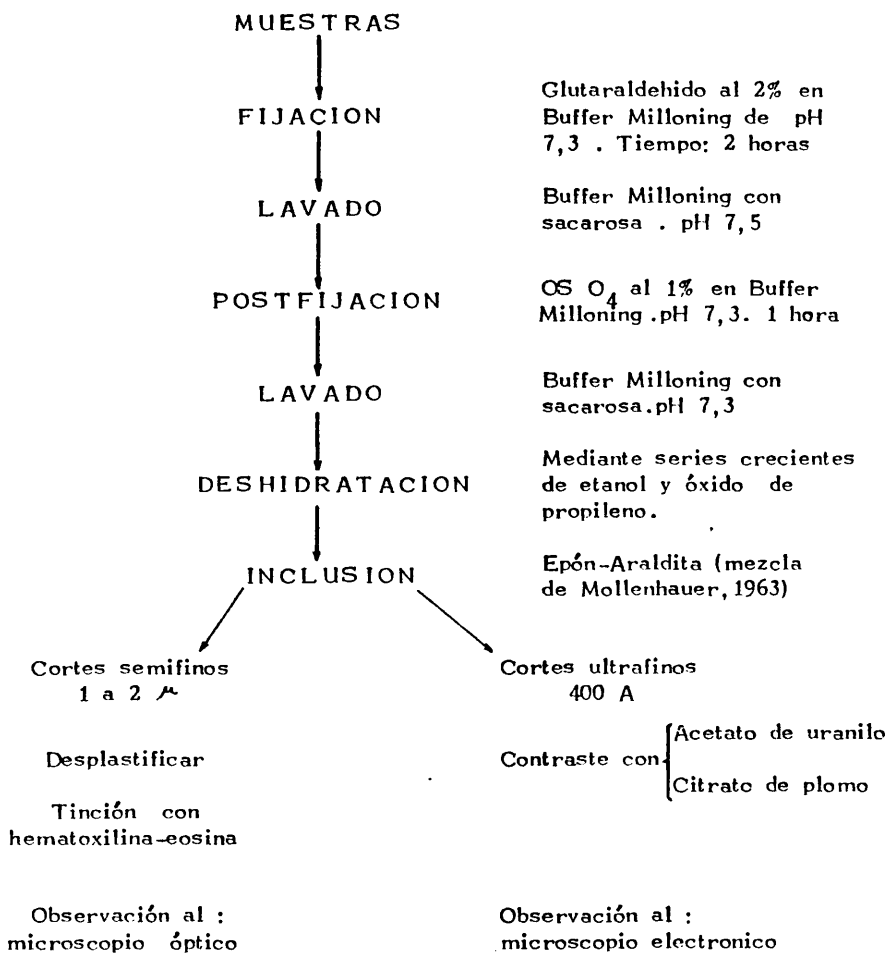
Paralelamente una porción de las muestras fué tratada/ convenientemente para su observación microscópica y ultramicros

cópica.

Finalmente, los animales inoculados y que no morían al cabo de 21 días eran sacrificados, procediéndose a partir de este momento del mismo modo que en los casos anteriores.

IV.13. TECNICAS DE OBSERVACION

Para la observación de tejidos, tanto a bajos aumentos - (microscopio óptico), como ultraestructuralmente (mediante el microscopio electrónico), las muestras se procesaron de la siguiente forma:



#### IV.14. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Todos los cálculos de los valores típicos de las distribuciones realizadas, los índices de dispersión (varianza y desviación tipo), estimación de la seguridad de los parámetros/ calculados y sus intervalos de confianza, además de los "tests" de homogeneidad de los valores hallados así como la comparación de sus índices, se han realizado según fórmulas obtenidas de -- los manuales de estadística Lamotte (188), Snedecor y col (295) y Sokal y col. (297).

## V. RESULTADOS

### V.1. AISLAMIENTOS

#### V.1.1. Primera etapa

Los resultados obtenidos tras estudiar el comportamiento de dos cepas de L. monocytogenes (una hemolítica y otra no) - en coprocultivos realizados con heces de ganado ovino y bovino - en diversos medios de recogida, enriquecimiento y aislamiento, - tras un tiempo variable de incubación y en los que se inocularon previamente estas listerias, quedan expuestos de la tabla A-1 a la A-18.

Recordemos que uno de los propósitos fundamentales de esta etapa era investigar el rendimiento de los distintos medios de aislamiento, con objeto de seleccionar aquellos en los que obtuvieramos mejores resultados. Para ello resembrabamos los coprocultivos patrones en los distintos medios probados. Una vez incubados (37°C durante 18-24 horas) del total de colonias - crecidas se seleccionaban aquellas, que por sus características morfológicas, podían corresponderse con listerias. Comprobándose con posterioridad su pertenencia al género.

Así mismo, elaboramos un coeficiente resultante de dividir el número de colonias positivas (que pertenecían al género)/ por el número total de seleccionadas. Indicándonos este coeficiente la facilidad con que las colonias de listeria eran visualizadas en el contexto de todo el crecimiento de la placa.

126

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	29	44	50
Colonias positivas	1	20	40
<u>Colonias positivas</u>	0,034	0,454	0,80
Colonias seleccionadas			

Tabla A-1: Cultivos en agua de peptona ramnosa. Cepa hemolftica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	30	42	44
Colonias positivas	1	20	37
<u>Colonias positivas</u>	0,033	0,476	0,84
Colonias seleccionadas			

Tabla A-2: Cultivos en agua de peptona ramnosa. Cepa no hemolftica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	28	40	42
Colonias positivas	0	18	28
<u>Colonias positivas</u>	0	0,45	0,46
Colonias seleccionadas			

Tabla A-3: Cultivos en caldo triptosa fosfato. Cepa - - hemolftica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	30	41	45
Colonias positivas	1	19	27
<u>Colonias positivas</u>	0,033	0,46	0,6
Colonias seleccionadas			

Tabla A-4: Cultivos en caldo triptosa fosfato. Cepa no hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	27	43	41
Colonias positivas	2	19	33
<u>Colonias positivas</u>	0,07	0,44	0,80
Colonias seleccionadas			

Tabla A-5: Cultivos en caldo triptosa fosfato nalidixico. Cepa hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	30	42	39
Colonias positivas	1	20	28
<u>Colonias positivas</u>	0,03	0,47	0,71
Colonias seleccionadas			

Tabla A-6: Cultivos en caldo triptosa fosfato nalidixico. Cepa no hemolítica.



123

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	26	52	51
Colonias positivas	3	23	35
<u>Colonias positivas</u>	0,11	0,44	0,68
Colonias seleccionadas			

Tabla A-7: Cultivos P.N.P.A. a 15°C, provenientes de --  
agua de peptona ramosa. Cepa hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	19	47	51
Colonias positivas	8	22	28
<u>Colonias positivas</u>	0,42	0,46	0,54
Colonias seleccionadas			

Tabla A-8: Cultivos en P.N.P.A. a 15°C, provenientes de  
caldo triptosa fosfato. Cepa hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	15	44	38
Colonias positivas	2	22	37
<u>Colonias positivas</u>	0,13	0,5	0,97
Colonias seleccionadas			

Tabla A-9: Cultivos en P.N.P.A. a 15°C, provenientes de  
caldo triptosa fosfato nalidíxico. Cepa - -  
hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	17	58	57
Colonias positivas	2	28	41
Colonias positivas			
<hr/>	0,11	0,48	0,71
Colonias seleccionadas			

Tabla A-10: Cultivos en P.N.P.A. a 15°C, provenientes -  
de agua de peptona ramosa. Cepa no hemolif  
tica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	20	42	46
Colonias positivas	5	16	35
Colonias positivas			
<hr/>	0,25	0,38	0,76
Colonias seleccionadas			

Tabla A-11: Cultivos en P.N.P.A. a 15°C, provenientes -  
de caldo triptosa fosfato. Cepa no hemolif  
tica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	15	46	39
Colonias positivas	1	22	27
Colonias positivas			
<hr/>	0,06	0,47	0,69
Colonias seleccionadas			

Tabla A-12: Cultivos en P.N.P.A. a 15°C, provenientes -  
de caldo triptosa fosfato nalidíxico. Cepa  
no hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	23	62	55
Colonias positivas	2	32	46
<u>Colonias positivas</u>	0,08	0,51	0,85
Colonias seleccionadas			

Tabla A-13: Cultivos en P.N.P.A. a 4°C, provenientes de agua de peptona ramnosa. Cepa hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	23	50	55
Colonias positivas	4	20	45
<u>Colonias positivas</u>	0,17	0,40	0,81
Colonias seleccionadas			

Tabla A-14: Cultivos en P.N.P.A. a 4°C, provenientes de caldo triptosa fosfato. Cepa hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	22	42	48
Colonias positivas	0	19	39
<u>Colonias positivas</u>	0	0,45	0,81
Colonias seleccionadas			

Tabla A-15: Cultivos en P.N.P.A. a 4°C, provenientes de caldo triptosa fosfato nalidíxico. Cepa -- hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	22	54	59
Colonias positivas	3	27	46
<u>Colonias positivas</u>	<u>0,13</u>	<u>0,50</u>	<u>0,77</u>
Colonias seleccionadas			

Tabla A-16: Cultivos en P.N.P.A. a 4°C, provenientes de agua de peptona rammosa. Cepa no hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	26	59	49
Colonias positivas	4	27	42
<u>Colonias positivas</u>	<u>0,15</u>	<u>0,45</u>	<u>0,85</u>
Colonias seleccionadas			

Tabla A-17: Cultivos en P.N.P.A. a 4°C, provenientes de caldo triptosa fosfato. Cepa no hemolítica.

	<u>A.T.N.</u>	<u>A.N.P.</u>	<u>A.S.N.</u>
Colonias seleccionadas	23	48	47
Colonias positivas	2	23	36
<u>Colonias positivas</u>	<u>0,08</u>	<u>0,47</u>	<u>0,76</u>
Colonias seleccionadas			

Tabla A-18: Cultivos en P.N.P.A. a 4°C, provenientes de caldo triptosa fosfato nalidíxico. Cepa no hemolítica.

Otro dato muy interesante a estudiar, era el tiempo óptimo de incubación. En la tabla A-19, como puede apreciarse, hemos reflejado el número total de colonias que aislamos a partir de los medios que manteníamos incubando a 4°C y 15°C respectivamente, tras diversos periodos de incubación.

<u>Tiempo Días</u>	<u>Nº de Colonias</u>		
	<u>4°C</u>	<u>15°C</u>	<u>Total</u>
17	49	47	96
24	58	74	132
31	89	69	158
38	123	57	180
45	142	39	181
52	141	36	177
60	138	32	170

Tabla A-19: Nº de colonias aisladas a 4°C y 15°C.

Este dato queda también reflejado en el polígono de frecuencias representado en la figura A-1, en el que se puede observar la evolución de los aislamientos realizados a partir de los medios de enriquecimiento a 4°C y 15°C.

Como puede apreciarse por los datos anteriormente expuestos, el máximo de colonias aisladas, cuando los medios de enriquecimiento se mantenían a 4°C, se corresponde con los aislamientos que se practicaron en el día 45 de incubación, con un 19,18%. Mientras que cuando el enriquecimiento se realizó a 15°C el máximo de aislamientos coincidió con el día 24 de enriquecimiento, obteniendo este día un 20,54% del total de aislamientos.

Luego, el tiempo de incubación se reduce notablemente cuando los cultivos se enriquecen a 15°C en lugar de a 4°C; sin embargo, también se reduce el número de colonias aisladas, 740 a 4°C frente a 354 a 15°C, esto es un 47,83% de las aisladas a 4°C.

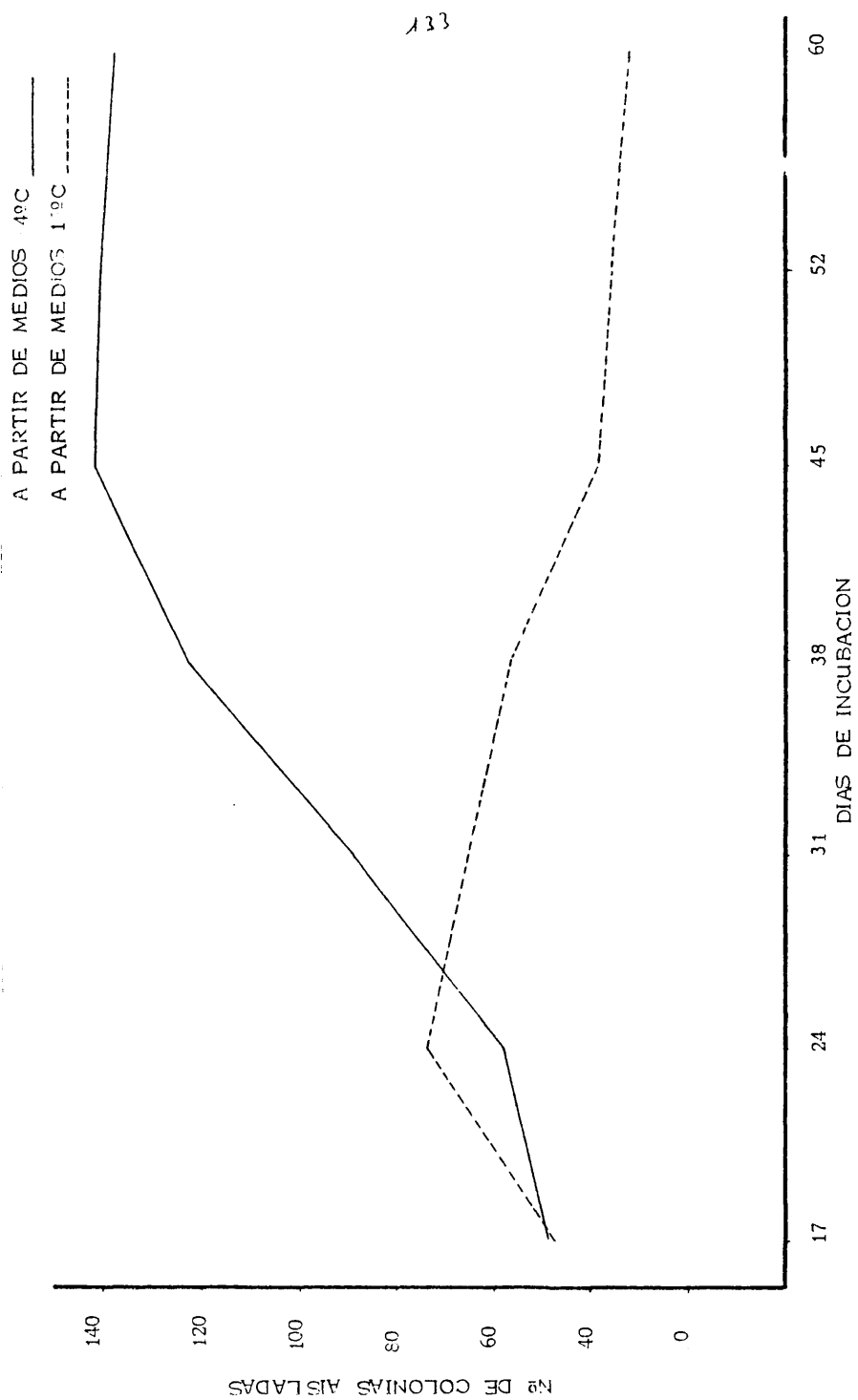


FIGURA A-1, EVOLUCION DE LOS AISLAMIENTOS A 4 Y 15°C

Por otra parte, el medio solido en el que nos han sido/ más fáciles los aislamientos por distinguir mejor las colonias - de listeria de las del resto de contaminantes, ha sido el Agar - sangre nalidíxico con un total de 650 colonias aisladas frente a 856 preseleccionadas y por tanto con un coeficiente de colonias aisladas positivas/colonias seleccionadas = 0,75.

Para el medio Agar ramosa nalidíxico polimixina B, la cifra de colonias aisladas en total es de 854 frente a 397 positivas, con un coeficiente colonias aisladas positivas/colonias - seleccionadas = 0,46.

Para el medio Agar nalidíxico telurito potásico, estas cifras son de 42 colonias aisladas frente a 425 seleccionadas, - con un coeficiente igual a 0,098.

El medio de recogida a partir del que se han aislado -- más listerias ha sido el medio Agua de peptona ramosa con 119 - colonias, esto es un 37,7% de colonias aisladas frente al 32,6% que se aislaron a partir del medio Caldo triptosa fosfato nalidíxico y 29,52% a partir del Caldo triptosa fosfato, habiéndose -- aislado 161 cepas hemolíticas y 154 no hemolíticas.

La utilización de medios de enriquecimiento ha supuesto el aislamiento de 774 colonias frente a 315 que se aislaron a -- partir de los medios de recogida, esto es un 71,7% del total de los aislamientos. Correspondiendo el máximo de colonias aisladas a los enriquecimientos que se hicieron a partir del Agua de peptona ramosa con 288 colonias aisladas, esto es un 37,2% del total, representando las aisladas a partir de los enriquecimientos del Caldo triptosa fosfato el 33,07% y el 29,7% las aisladas a partir de los enriquecimientos del Caldo triptosa fosfato nalidíxico.

#### V.1.2. Segunda etapa

Durante esta segunda etapa, se aislaron un total de 175 cepas de Listeria, correspondientes todas a la especie L. monocytogenes.

De ellas, 118 se obtuvieron a partir de las heces de 61/ovejas que se corresponden con el 5,54% de los animales muestreados, las 57 restantes se aislaron de las heces de 32 vacas que corresponden al 4,26% de las muestreadas.

La evolución de los aislamientos, así como el medio sobre el que se aislaron, pueden observarse en las tablas A-20, -- A-21 y en las figuras A-2, A-3 y A-4.

De las 61 muestras de ganado ovino que resultaron positivas, todas lo fueron sobre el medio Agar sangre nalidixico y 57 (93,4%) lo fueron sobre Agar suero nalidixico tripaflavina.

De los 32 coprocultivos positivos de ganado vacuno, 31 (96,8%) lo fueron sobre Agar sangre nalidixico y 26 (81,25%) sobre Agar suero nalidixico tripaflavina.



AISLAMIENTO MEDIOS	1 mes		2º mes		3 mes		4º mes		5º mes		6º mes		TOTAL	
	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV
A.S.N.	6	2	10	7	17	11	16	3	7	6	5	2	61	31
A.S.N.T.	8	2	19	10	4	6	21	3	4	3	1	2	57	26
TOTAL	14	4	29	17	21	17	34	6	11	10	6	3	118	57

TABLA A-20 :EVOLUCION DE AISLAMIENTOS

	1 mes		2º mes		3 mes		4º mes		5º mes		6º mes		TOTAL	
	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV	OVI	BOV
TOTALES	13	4	23	14	17	9	6	1	2	3	0	1	61	32
TOTALES ACUMULADOS	13	4	36	18	53	27	59	28	61	31	61	32	61	32
PORCENTAJE	1,18	0,53	2,09	1,86	1,54	1,20	0,54	0,13	0,18	0,40	0	0,13	5,53	4,25

TABLA A-21:EVOLUCION DE PORTADORES

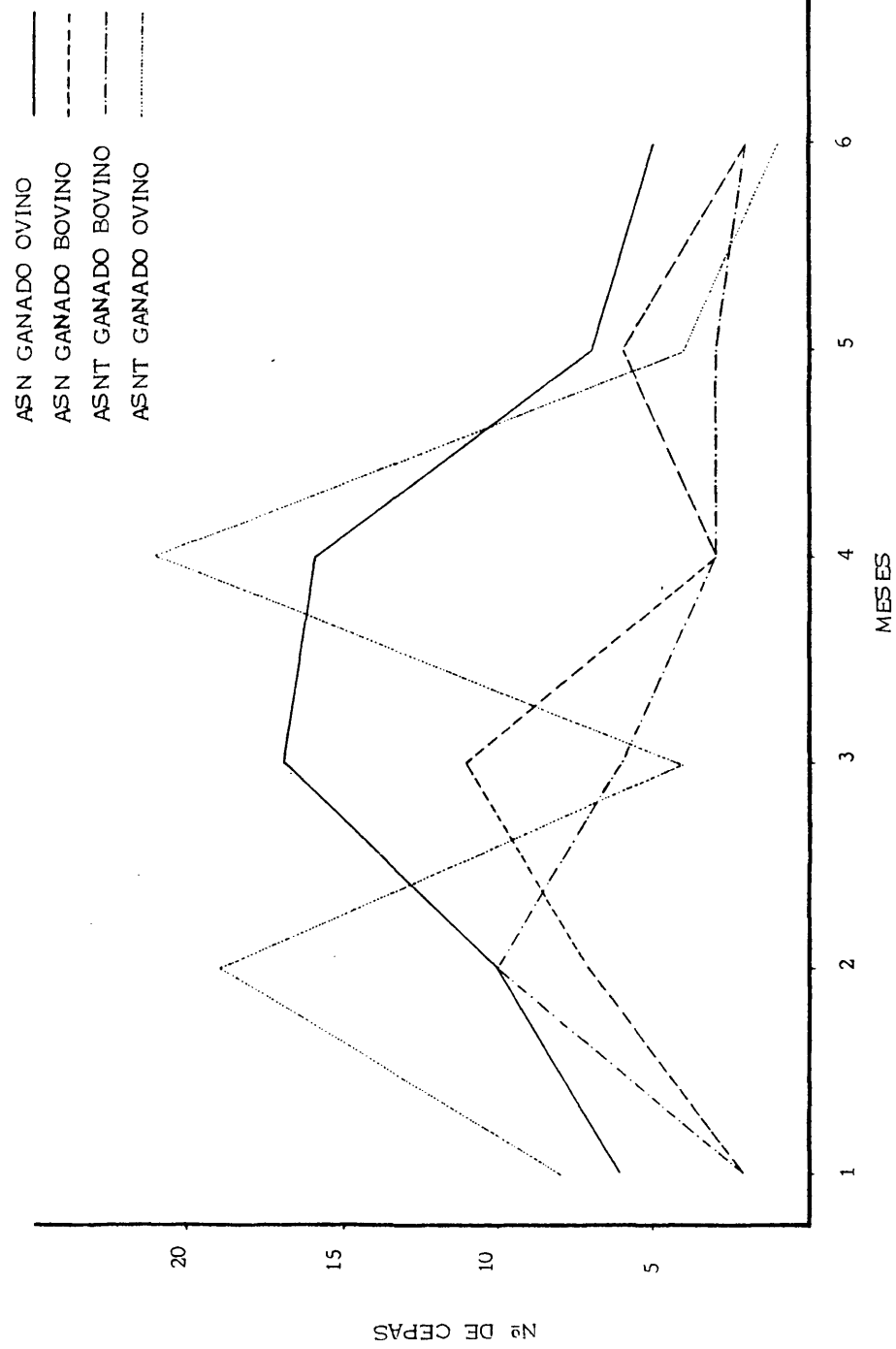


FIGURA A-2 EVOLUCION DE AISLAMIENTOS

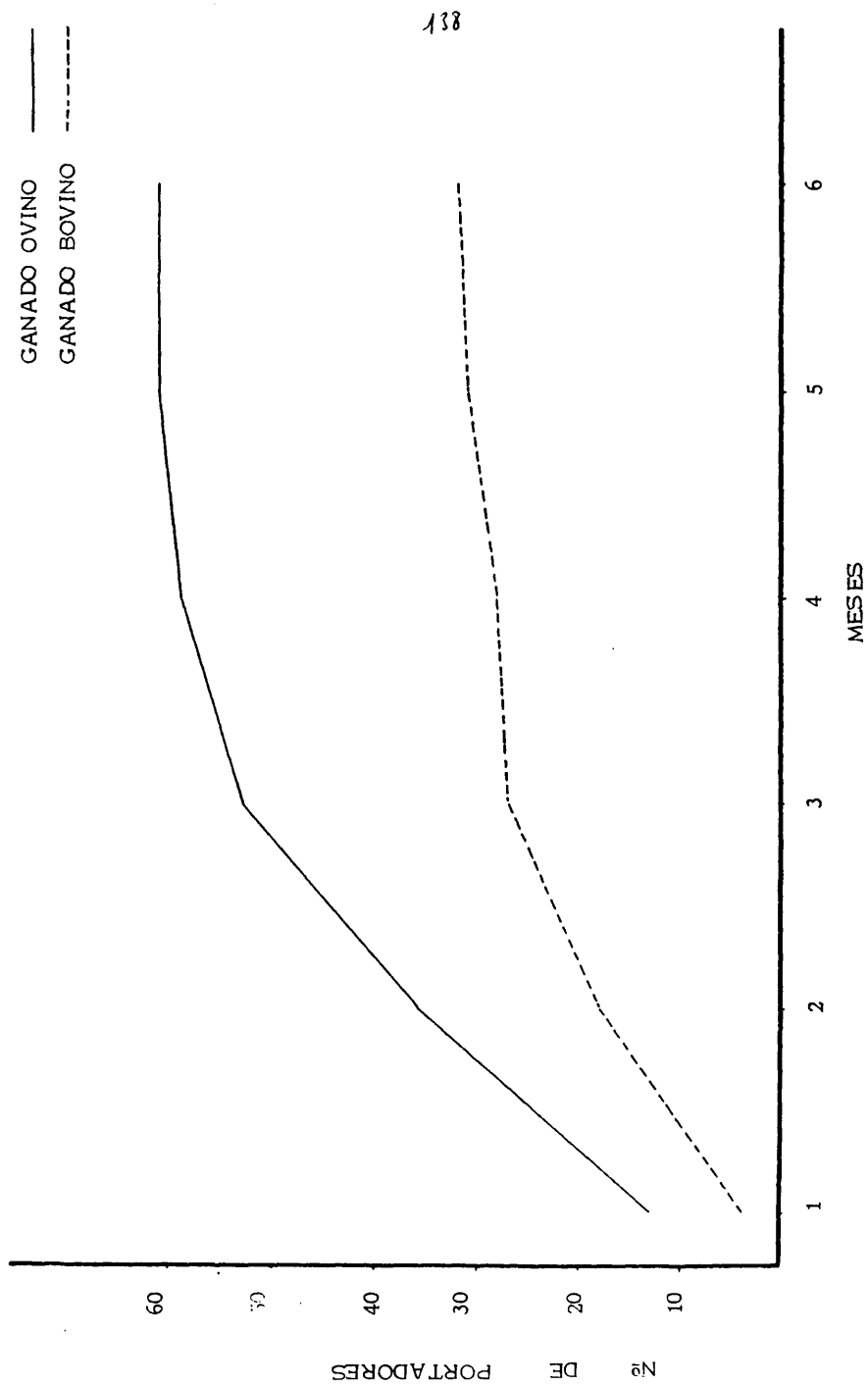


FIGURA A-3: EVOLUCION ACUMULADA DE PORTADORES

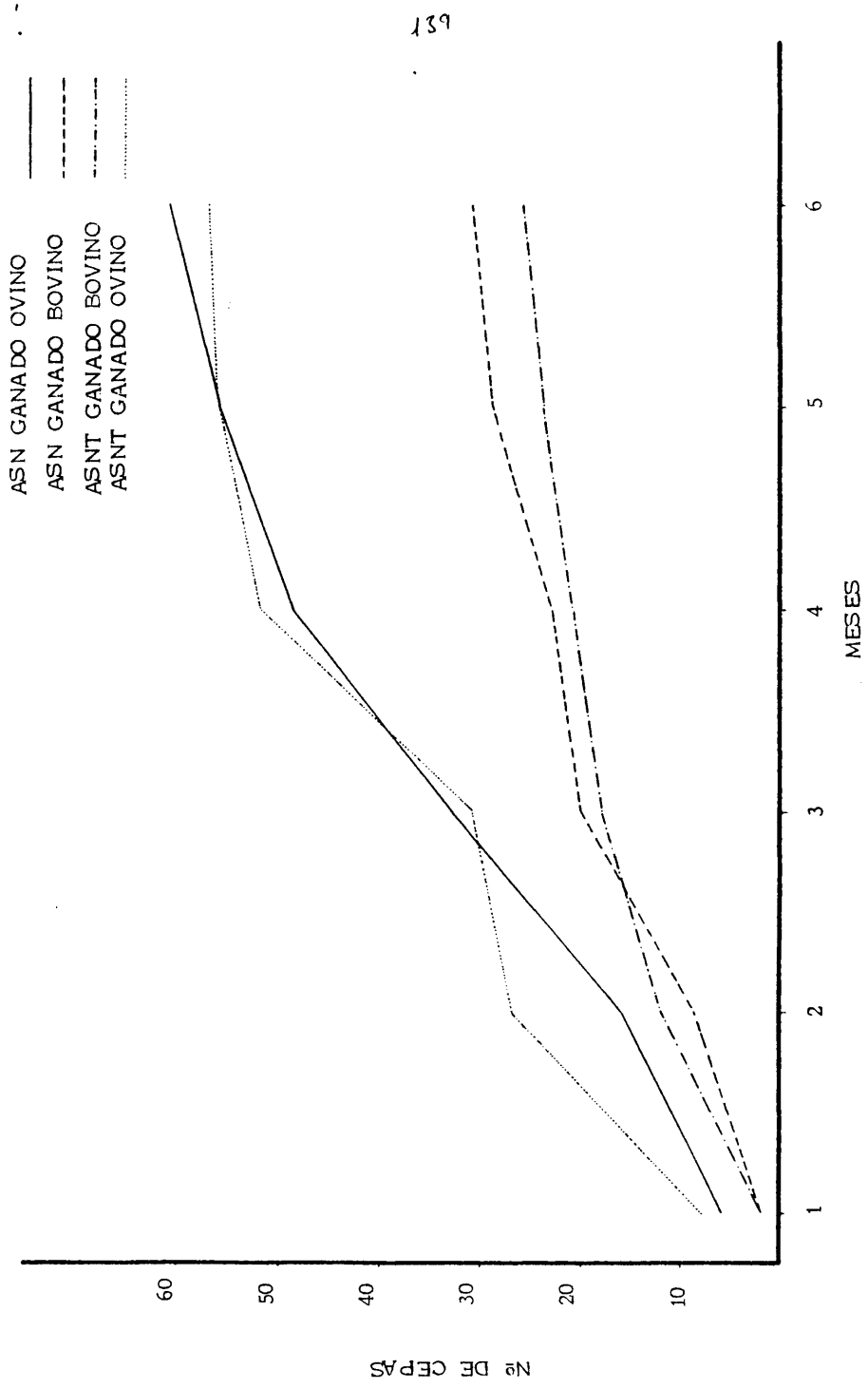


FIGURA A-4: EVOLUCION ACUMULADA DE AISLAMIENTOS

	1 mes	2º mes	3 mes	4º mes	5º mes	6º mes	TOTAL
L.monocytogenes	8	12	12	16	16	11	75
L.grayi	46	21	36	43	27	15	188
L.murrayi	4	3	3	8	0	0	18
L.denitrificans	5	0	0	0	0	0	5
TOTAL	63	36	51	67	43	26	286

TABLA A-25:NUMERO TOTAL DE CEPAS AISLADAS POR EL METODO MODIFICADO

	1 mes	2º mes	3 mes	4º mes	5º mes	6º mes	TOTAL
L.monocytogenes	2	1	3	2	1	0	9
L.grayi	2	0	0	0	0	0	2
L.murrayi	0	0	0	0	0	0	0
L.denitrificans	6	2	0	0	0	0	8
TOTAL	10	3	3	2	1	0	19

TABLA A-26:NUMERO TOTAL DE CEPAS AISLADAS POR LA METODOLOGIA CLASICA

### V.1.3. Tercera etapa

En esta tercera etapa se muestrearon sistemáticamente - 100 ovejas elegidas al azar de un rebaño de 300, mediante la sis temática clásica y la puesta a punto por nosotros. Encontrando/ los siguientes resultados de aislamientos para cada una de las - especies de Listerias (tabla A-22 y figura A-5).

<u>Especie</u>	<u>Método clásico</u>	<u>Método modificado</u>
L. monocytogenes	5	20
L. grayi	2	80
L. murrayi	0	12
L. denitrificans	4	4

Tabla A-22: Resultado de los Aislamientos de las distin-  
tas estirpes de las cuatro especies de listerias.

Al observar la evolución de los portadores que se van - identificando (tabla A-23, A-24 y figuras A-6 y A-7) durante -- los seis meses de la experiencia, puede apreciarse como ya en el primer mes, con la metodología modificada, nos encontramos con un 44% de la población como portadora de alguna especie del género, representando los portadores de L. grayi un 90% del total.

Al final del tercer mes la cifra alcanza el 65%, elevan-  
dose este porcentajes hasta el 88% de los animales muestreados - al final del quinto mes, y no modificandose durante el sexto. - Con la metodología clásica, sólo conseguimos identificar un 6% - de animales como portadores durante los dos primeros meses, ci-- fra que pasa a un 9% en el tercer mes, no sufriendo posteriores/ incrementos durante los tres meses siguientes.

En las tablas A-25, A-26 y figuras A-8 y A-9' pueden ob-  
servarse el total de cepas aisladas en el conjunto de la expe- -  
riencia, así como el número de aislamientos realizados cada uno/  
de los meses.

	1 mes	2º mes	3º mes	4º mes	5º mes	6º mes
L.monocytogenes	8	11	12	18	20	20
L.grayi	40	44	59	72	80	80
L.murrayi	3	4	7	12	12	12
L.denitrificans	4	4	4	4	4	4
TOTAL	44	48	65	84	88	93

TABLA A-23: EVOLUCION ACUMULADA DE ANIMALES PORTADORES DE MICROORGANISMOS DEL GENE-RO LISTERIA, AISLADOS POR EL METODO MODIFICADO

	1 mes	2º mes	3 mes	4º mes	5º mes	6º mes
L.monocytogenes	2	2	5	5	5	5
L.grayi	2	2	2	2	2	2
L.murrayi	0	0	0	0	0	0
L.denitrificans	3	4	4	4	4	4
TOTAL	6	6	9	9	9	9

TABLA A-24: EVOLUCION ACUMULADA DE ANIMALES PORTADORES DE MICROORGANISMOS DEL GENE-RO LISTERIA AISLADOS POR EL METODO CLASICO

143

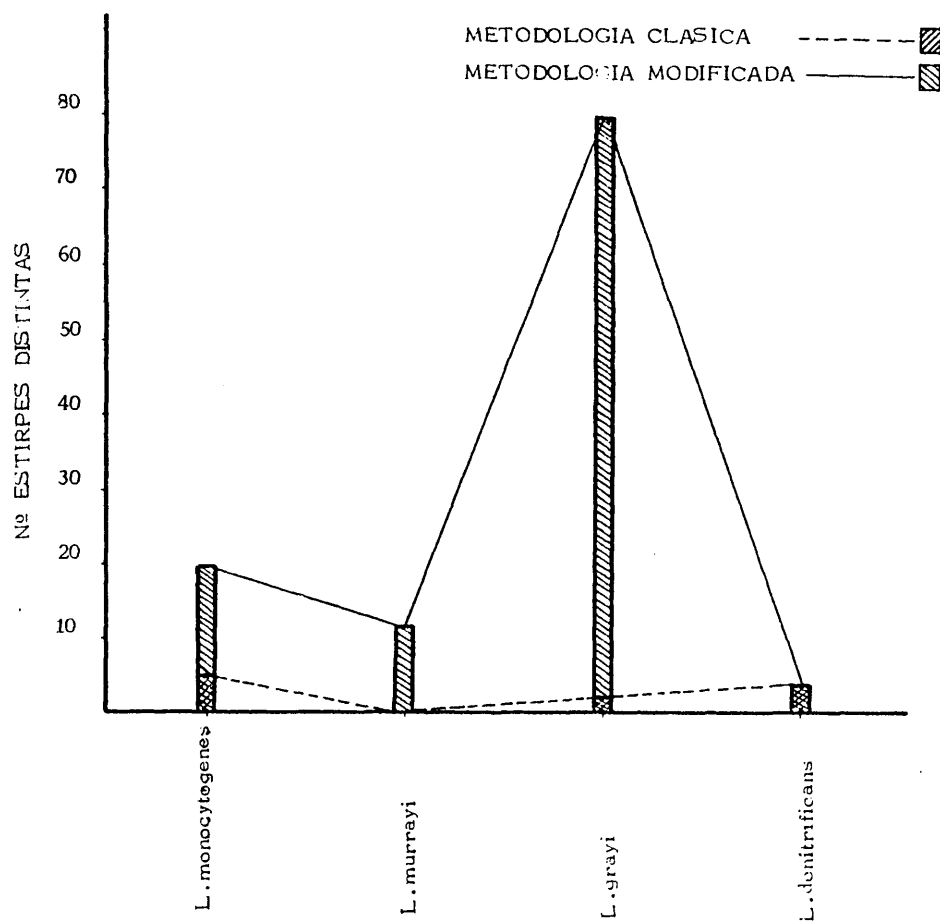


FIGURA A-5: ESTIRPES DISTINTAS DE LISTERIAS AISLADAS POR LAS 2 METODOLOGIAS.



Nº DE PORTADORES

444

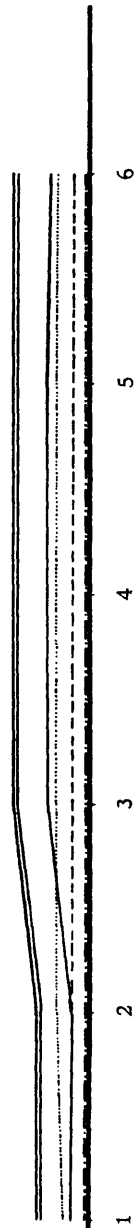


FIGURA - 6 EVOLUCION ACUMULADA DE PORTADORES METODO CLASICO

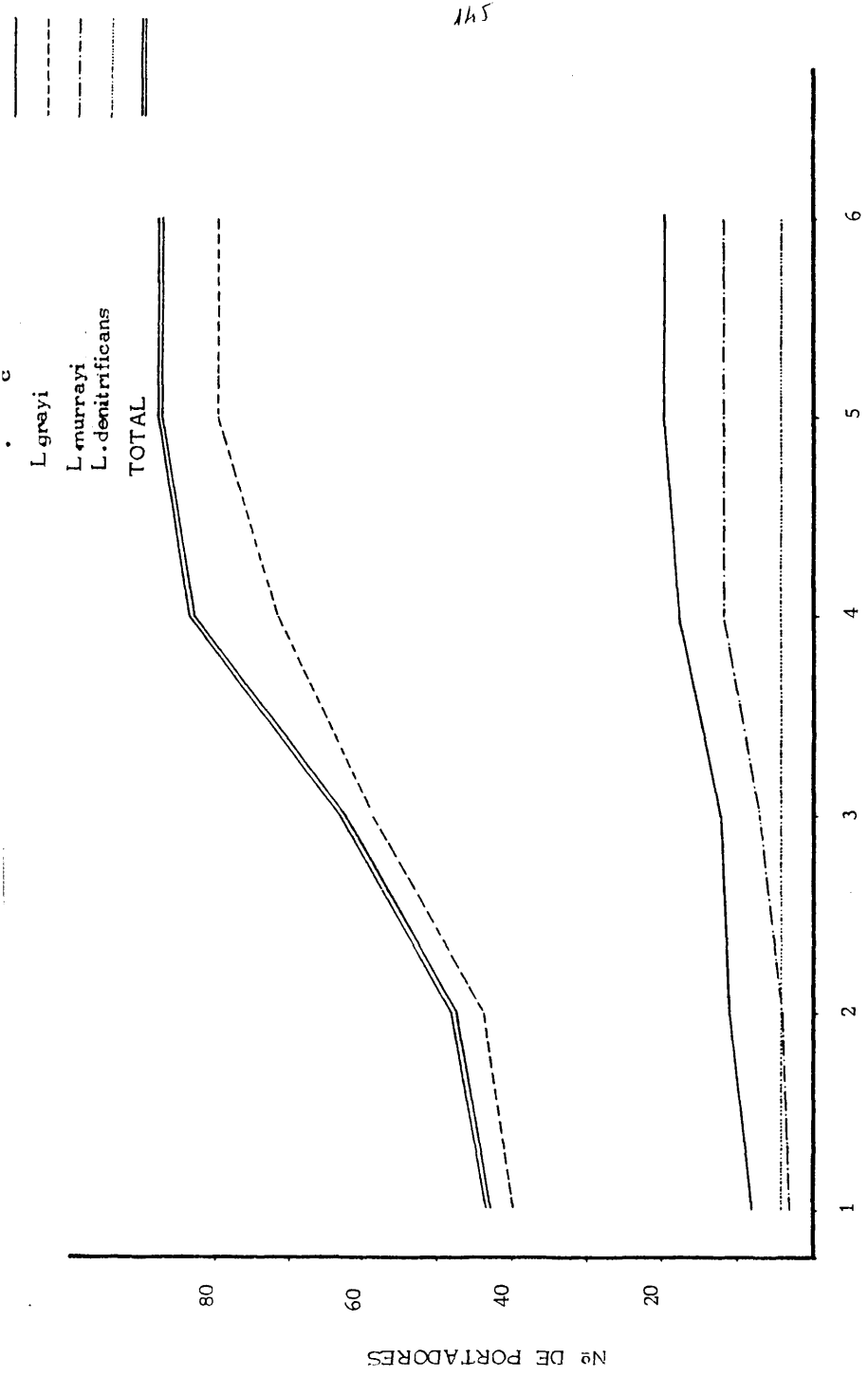


FIGURA A-7:EVOLUCION ACUMULADA PORTADORES METODO MODIFICADO.

Nº DE CEPAS

146

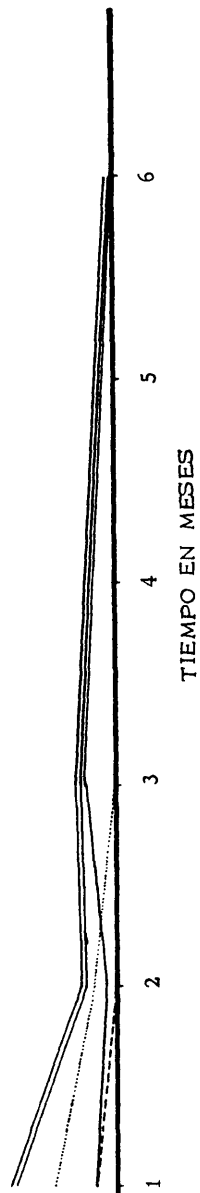


FIGURA A-8: Nº DE CEPAS AISLADAS METODO CLASICO.

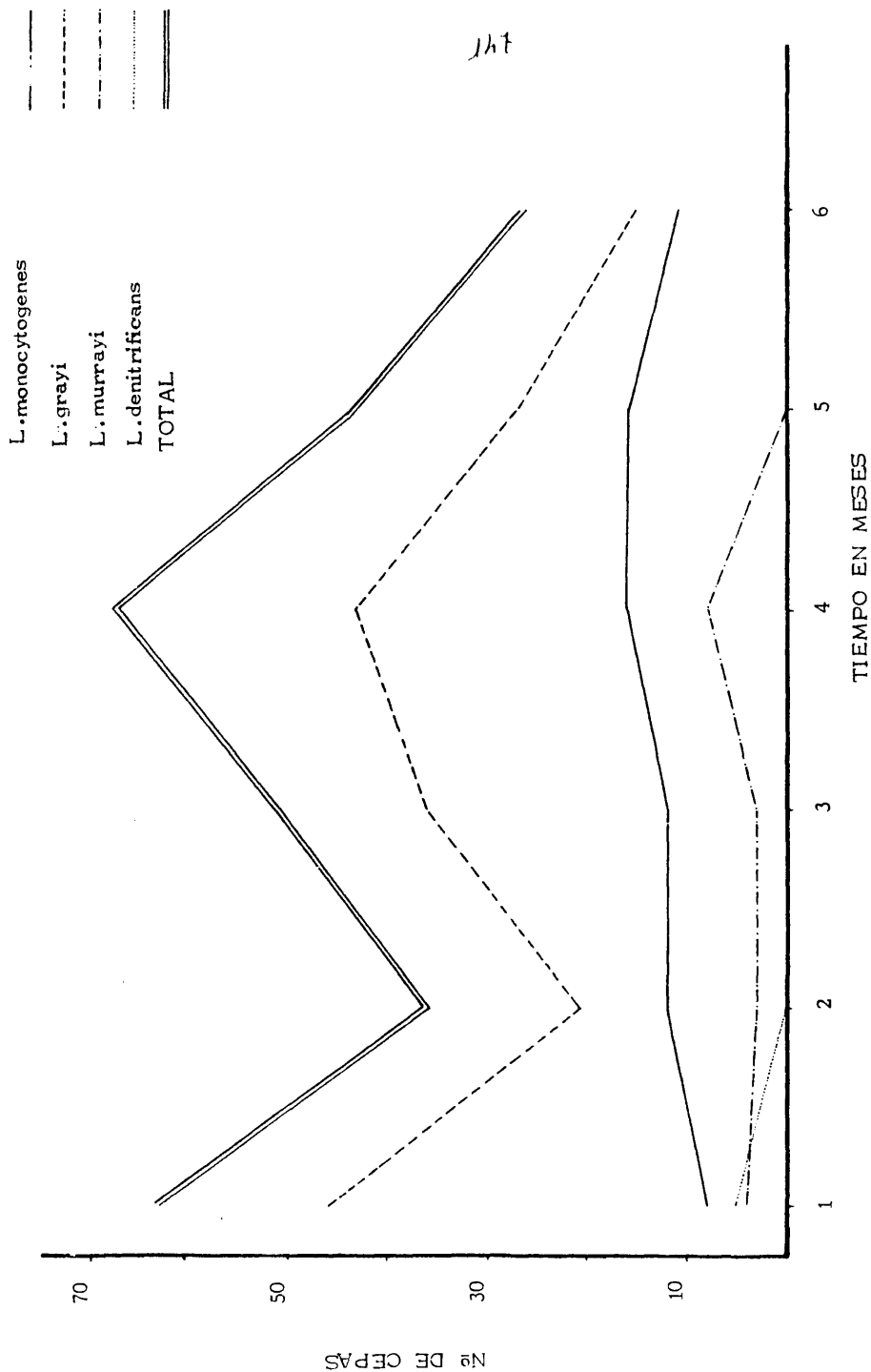


FIGURA A-8: Nº DE CEPAS AISLADAS METODO MODIFICADO

En las tablas A-27 y A-28 pueden observarse los resultados de los aislamientos efectuados a partir de cada uno de los medios de recogida y enriquecimiento y el número de cepas de cada una de las especies del género Listeria recuperadas sobre cada uno de los medios de aislamiento.

En la figura A-10 se representa el histograma del logaritmo neperiano de las frecuencias de aislamientos, sobre cada uno de los medios. Se han representado los logaritmos neperianos de las frecuencias únicamente para poder comparar los resultados de todos los medios sobre una misma tabla.

En la figura A-9, hemos representado el polígono de -- frecuencias de cada una de las especies del género; indicando -- también, aquellos casos en que de un mismo portador se aislaban/ listerias de más de una especie. Hemos encontrado que cuatro animales contenía en sus heces listerias de las especies L. monocytogenes, L. grayi y L. murrayi.

La parte superior del gráfico representa el porcentaje/ de animales en los que no se pudo aislar listerias en cada uno -- de los meses.

Para concluir, si comparamos estadísticamente las cifras de colonias aisladas por una y otra técnica, nos encontramos con una varianza igual a  $6,25 \cdot 10^{-4}$  y un error standar --  $Sd = 0,025$ ; siendo la diferencia de los porcentajes de aislamientos igual a 0,4450, luego la relación de la diferencia de los -- porcentajes con su error standar  $t = 17,8$ , cifra muchísimo mayor al valor de  $t$  de las desviaciones permitidas para una seguridad/ del 95% que es igual a 2. Luego, debemos admitir que las diferencias observadas en los aislamientos no son simplemente debidas al azar, sino que las frecuencias de aislamientos difieren -- significativamente por uno y otro método.

Si igualmente comparamos el porcentaje de portadores, -- nos encontramos con una varianza igual a  $4,9 \cdot 10^{-3}$  y un error --

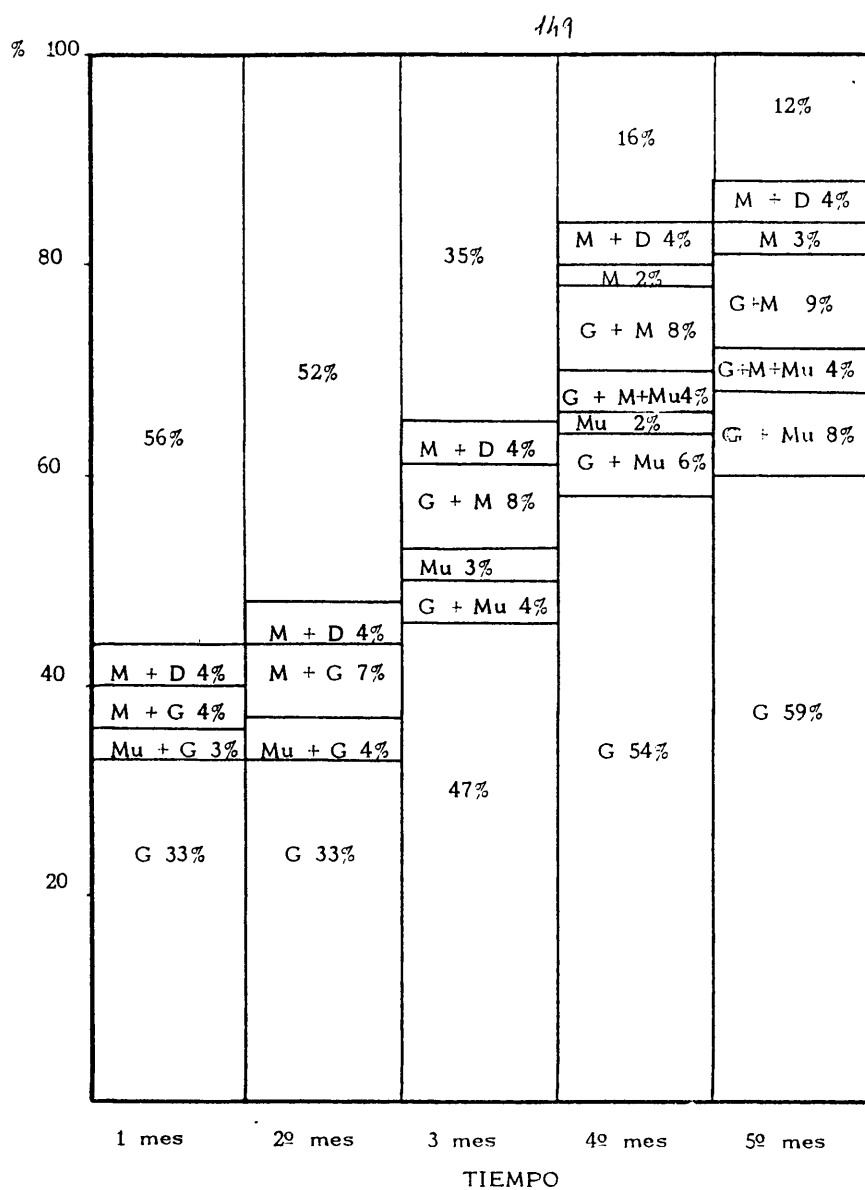


FIGURA A-9: EVOLUCION ACUMULADA DE PORTADORES DE MICROORGANISMOS DEL GENERO LISTERIA

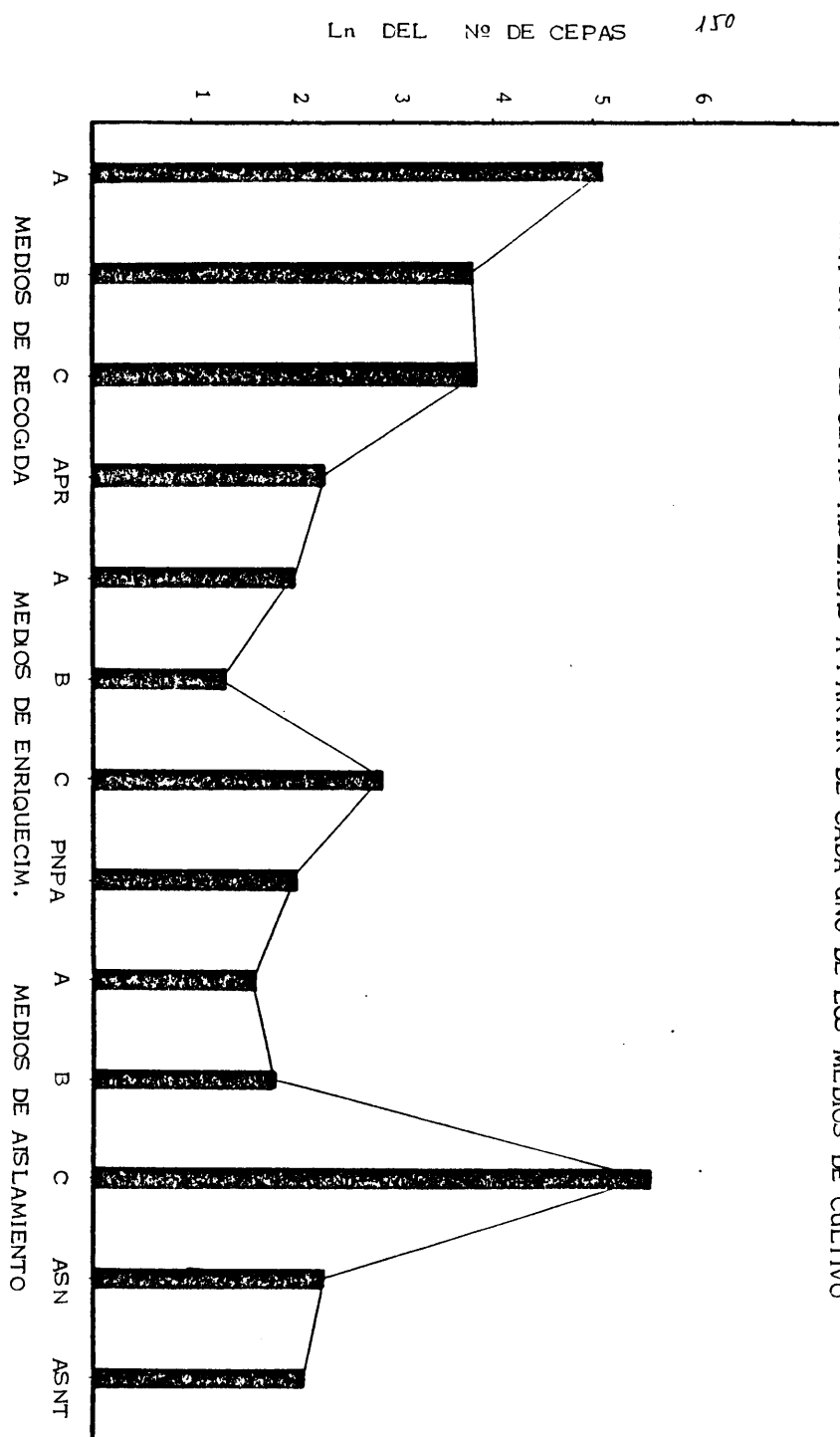


FIGURA-10: Nº DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE CADA UNO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

	MEDIO DE RECOGIDA				MEDIOS DE ENRIQUECIMIENT.				TOTAL
	A	B	C	APR	A	B	C		
L.monocytogenes	44	15	4	6	4	3	5	3	84
L.grayi	108	29	36	2	4	0	11	0	190
L.murrayi	12	1	2	0	0	1	2	0	18
L.denitrificans	0	0	5	3	0	0	0	5	13
TOTAL	164	45	47	11	8	4	18	8	305

TABLA A-27: NUMERO DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DE LOS DISTINTOS MEDIOS DE RECOGIDA Y ENRIQUECIMIENTO

	A	B	C	ASN	ASNT	TOTAL
	2	5	68	4	5	84
L.monocytogenes						
L.grayi	0	0	188	2	0	190
L..murrayi	2	0	16	0	0	18
L.denitrificans	1	1	3	4	4	13
TOTAL	5	6	275	10	9	305

TABLA A-28: NUMERO DE CEPAS AISLADAS SOBRE LOS DISTINTOS MEDIOS DE AISLAMIENTO



standar  $S_d = 0,070$ ; como la diferencia de porcentajes de los portadores es igual a 0,79, la relación entre la diferencia de los porcentajes y su error standar, por tanto, será igual a 11,28 - cifra igualmente muy superior al valor  $t = 2$  para una seguridad del 95%. Luego, las diferencias observadas no se deben simplemente al azar, sino que existe una diferencia significativa entre los dos métodos de aislamiento.

Abreviaturas empleadas

- A.T.N. = Agar telurito potásico ácido nalidíxico.
- A.N.P. = Agar ramnosa ácido nalidíxico polimixina B.
- A.S.N. = Agar sangre ácido nalidíxico
- P.N.P.A. = Agua de peptona ramnosa ácido nalidíxico  
polimixina B azul de metileno.
- A.S.N.T. = Agar suero ácido nalidíxico tripaflavina.

## V.2. PRUEBAS CON LOS MEDIOS DE CULTIVO

El aspecto que presentaban los cultivos de microorganismos del género Listeria variaba enormemente con el medio empleado.

Recordemos que la selección de colonias se hizo en base al aspecto morfológico que presentaban con luz transmitida o incidente, y que el momento oportuno para efectuar las resiembras/a partir de los medios de enriquecimiento era cuando se positivizaban los indicadores que contenían; pasamos pues a describir someramente, el aspecto de los distintos cultivos sobre los medios empleados.

### V.2.1 Medios de recogida

Todos los medios empleados en la recogida de heces, salvo el medio de recogida C, no contenían ningún tipo de indicador y eran transparentes. Por otra parte, como todos contenían restos de material fecal que enturbiaban el medio y producían sedimento, era muy difícil matizar objetivamente a simple vista en que momento se producía el crecimiento, y nos limitamos, como es tá indicado en el capítulo de Material y Métodos, a realizar resiembras cada cierto tiempo, siguiendo el protocolo que establecimos al ensayar los distintos medios, y que se correspondía con los momentos a partir de los cuales era posible aislar listerias, si éstas estaban de forma viable.

Como ninguno de los medios de recogida, salvo el Caldo/triptosa fosfato nalidíxico, contenían inhibidor alguno, y éste/lo poseía en una concentración (40 mg/l) que permitía perfectamente el crecimiento de todas las especies de Listeria. Todas las cepas del género que se probaron en estos medios crecían perfectamente a todas las temperaturas ensayadas.

En el medio de recogida C, al contener esculina y citrato amónico férrico, se observó que cuando la flora que contenía/ era capaz de hidrolizar la esculina, y todas las listerias lo -- son, se reducía el ión férrico a ferroso, con el ennegrecimiento consecuente del medio a que ello conlleva (fotografía nº 1). -- Siendo en este momento cuando comenzábamos a practicar los aislamientos a partir de este medio.

#### V.2.2. Medios de enriquecimiento

Los resultados sobre las posibilidades de crecimiento -- de las 59 cepas bacterianas de géneros y especies diversos y las 23 estirpes de listerias que probamos sobre los medios de enriquecimiento quedan expresados en la tabla M-1, teniendo en cuenta que los cultivos se practicaron a 22°C y el tiempo de incubación se prolongó hasta una semana.

Medio A.- Este medio de color original azul negruzco -- por contener tripán azul, sufre una pérdida total de su color -- original, cuando las listerias se multiplican en su seno por reducción del colorante, quedando de un color amarillo y con un sedimento abundante en el fondo de aspecto mucoso, que no suele de integrarse al agitar (fotografía nº 2).

Es un medio de crecimiento rápido, pues a 22°C ya en -- las primeras 24 horas, se comienza a apreciar el aclaramiento -- del mismo, iniciándose en este momento los aislamientos a partir de él.

En cuanto a su selectividad, podemos decir que a pesar de las sustancias inhibidoras que contiene (5% de cloruro sódico, -- 5,3% de fosfato disódico,  $2 \cdot 10^6$  UI/l de polimixina B, 80mg/l de tripán azul y 50mg/l de ácido nalidíxico) todos los microorganismos del género Listeria crecen perfectamente y sin menoscabo al-

guno. Unicamente algunas cepas de L. grayi producen crecimien--  
tos con depositos mucho más tenúes y con cambios de coloración -  
incompletos. Para el resto de la flora entérica, el medio se --  
comportó como suficientemente inhibidor del crecimiento.

Medio B.- Al igual que el medio A y por contener tri--  
pán azul, la coloración original es azul. A pesar de tener me--  
nos sustancias inhibidoras que el anterior (no contiene polimixi--  
na B) es de crecimiento más lento, al ser la ramosa un azúcar -  
menos fermentescibles por las listerias, no apareciendo casi nun--  
ca el color amarillo vivo que se produce en el medio A, quedando  
de un color más tenue y transparente (fotografía nº 3).

Los crecimientos son menos abundantes y suelen aparecer  
con un aspecto granular o floculento, dispersandose fácilmente -  
al agitar y no presentando el aspecto viscoso del medio A.

Las listerias crecen perfectamente aislandose todas --  
las especies del género, aunque algunas cepas, sobre todo de las/  
especies L. grayi y L. murrayi, apenas reduzcan el color original.

Bastante selectivo para la flora entérica a 22°C, este/  
medio permite un fácil aislamiento de listerias. Los aislamien--  
tos comienzan a practicarse en el momento que existen signos evi--  
dentes de crecimiento, bien por aclaramiento del color o por en--  
turbiamiento del medio.

Medio C.- Este medio se confeccionó para enriquecer los  
cultivos de listerias aprovechando su resistencia a crecer en --  
presencia de ciertas sustancias inhibidoras, y su capacidad de -  
presentar movilidad a 22°C (fotografía nº 4).

De un color original azul marino, sufre dos tipos de mo--  
dificaciones, conforme las bacterias se multiplican en él. De -  
una parte la pérdida del color original azul y por otra un enne--  
grecimiento debido a la reducción del citrato amónico férrico --  
por hidrólisis de la esculina. Estos cambios comienzan de abajo  
a arriba, a partir del lugar en que desemboca el tubo en el que/

se hace el inóculo.

Los aislamientos, se inician a partir del momento en -- que el ennegrecimiento llega a unos dos cm de la superficie.

Todos los microorganismos del género son capaces de crecer en él ennegreciéndolo. Gracias a ésto se consigue, a pesar - de ser un medio poco selectivo, la recuperación de ciertas cepas de listerias que no se aislaban por otros sistemas.

Medio de Despierres (71)..- De un color original azul, / por contener azul de metileno sufre una pérdida de este color al multiplicarse las bacterias en su seno, quedando practicamente - incoloro al reducirse esta sustancia (fotografía nº 5).

Resulta excesivamente selectivo para las listerias, a - pesar de que las concentraciones de las sustancias inhibidoras - están muy por debajo de lo que son capaces de soportar los micro organismos del género. Existiendo cepas de las cuatro especies / que no son capaces de crecer en el medio, pero sobre todo las -- pertenecientes a las especies L. grayi, L. murrayi y L. denitri-  
ficans.

El crecimiento aparece como un depósito granular o flo- culento, no demasiado abundante y que se disgrega al agitar. - Los aislamientos se inician a partir del momento en que se obser- van signos evidentes de crecimiento por pérdida de color o apari- ción de sedimento, ya que, debido a la continua reoxidación del - azul de metileno, puede pasarnos inadvertida la reducción cuando / estamos trabajando con gran cantidad de material. El tiempo de / crecimiento es bastante rápido en los casos positivos (24-48 ho- ras a 22°C) y la selectividad no es excesivamente buena, pues per- mite el crecimiento de otros gérmenes de la flora entérica e in- hibe el crecimiento de algunas listerias.

### V.2.3. Medios de aislamiento

A continuación vamos a comentar el aspecto que presentan los distintos tipos de crecimientos y colonias sobre cada uno de los medios de aislamiento ensayados. Quedando en la tabla M-2 expresados los resultados sobre la capacidad de crecimiento de las 60 estirpes de diversos microorganismos que probamos sobre ellos.

Agar sangre..- Medio general de aislamiento, donde los microorganismos del género crecen perfectamente con su color propio, observándose la producción de pigmento si los microorganismos poseen esta capacidad. El crecimiento es abundante, con colonias grandes entre 1 y 2 mm de diámetro, planas, convexas o ligeramente prominentes dependiendo de estirpes, y con el borde irregular; presentando las colonias con luz incidente, las iriscaciones propias del género (fotografías números 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12).

Si al Agar sangre se le suplementa con un 0,5% de glucosa, se observa por lo menos una hemólisis parcial y un cierto grado de digestión, aún en las cepas de L. grayi y L. murrayi. Además las colonias son bastante más mucosas y de tamaños más uniformes que en el caso de no llevarla incorporada (fotografías números 6 y 7).

En cuanto a la pigmentación, en líneas generales podemos decir que en el medio con glucosa se observa una coloración amarillo-limón en cultivos de más de 72 horas de L. grayi y L. murrayi; presentando un pigmento amarillo-parduzco, prácticamente marrón, las cepas de L. denitrificans y un color grisáceo amarillento, o sea, prácticamente sin pigmento las de L. monocytogenes.

Por supuesto no es un medio selectivo, apareciendo prácticamente todas las contaminaciones que existan en el inócu-

TABLA M-2: CRECIMIENTO DE LOS DISTINTOS GENEROS Y ESTIRPES PROBADOS EN LOS MEDIOS DE AISLAMIENTO

ESTIRPES	MEDIOS									
	A	B	C	ASN	ASNT	ATN	ATT	ARNP	AS	
L.denitrificans(Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.grayi(Se)	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
L.grayi(Iv)	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
L.monocytogenes 1/2a (Se)	+	?	+	+	?	+	+	+	+	
L.monocytogenes 1/2b (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 1/2c (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 3a (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 3b (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 3c (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 4a (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 4ab(Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 4b (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 4c (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 4d (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 4e (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 5 (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 7 (Se)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L.monocytogenes 1/2a (Iv)	+	?	+	+	?	+	+	+	+	

TABLA M-2: (continuación)

ESTIRPES			MEDIOS								
			A	B	C	ASN	ASNT	ATN	ATT	ARNP	AS
L.monocytogenes	4b (Iv)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L.monocytogenes	5 (Iv)	+	?	+	+	+	?	+	+	+	+
L.monocytogenes	6 (Iv)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L.murrayi	(Se)	-	-	?	+	-	-	+	+	+	+
L.murrayi	(Iv)	+	-	?	+	-	-	+	+	+	+
A.faecalis	1	?	-	?	?	-	?	-	N.T	-	+
A.faecalis	2	-	-	-	-	-	-	-	N.T	-	+
B.cereus	FX87	-	-	-	?	-	-	-	N.T	?	+
B.cereus	T16/5	-	-	-	N.T	-	-	-	N.T	N.T	+
B.cereus	X38/5	-	-	-	?	-	-	?	N.T	?	+
B.cereus	T35F	-	-	-	?	-	-	?	N.T	?	+
B.cereus	1	-	-	-	?	-	-	?	N.T	?	+
B.cereus	2	-	-	-	?	-	-	-	N.T	?	+
B.circulans	1	-	-	-	N.T	-	-	?	N.T	N.T	+
B.circulans	2	-	-	-	-	-	-	-	N.T	-	+
B.megaterium	CCB24	-	-	-	?	-	-	-	N.T	-	+
B.megaterium	1	?	-	-	?	-	-	?	N.T	?	+
B.subtilis	CCB19	-	-	-	?	-	-	-	N.T	?	+
B.subtilis	1	?	-	-	?	-	-	?	N.T	?	+



TABLA M-2: (continuación)

ESTIRPES		MEDIOS						ARNP	AS
A	B	C	ASN	ASNT	ATN	ATT			
C.agropyri M27	-	-	?	-	+	N.T	+	+	
E.cloacae	-	-	?	-	-	N.T	-	+	
E.coli	-	-	?	-	-	N.T	-	+	
K.pneumoniae	-	-	-	-	-	N.T	-	+	
M.luteus	?	-	+	-	+	N.T	+	+	
M.nonliquefaciens	-	-	-	-	-	N.T	-	+	
Moraxella sp.	?	-	?	-	?	N.T	?	+	
P.rettgeri	-	-	?	-	-	N.T	?	+	
P.vulgaris 1	-	-	?	-	-	N.T	?	+	
P.vulgaris 2	-	-	?	-	-	N.T	?	+	
P.aeruginosa CCB47	-	-	?	-	-	N.T	?	+	
P.fluorescens 1	-	-	?	-	-	N.T	?	+	
P.fluorescens 2	-	-	?	-	-	N.T	-	+	
S.typhimurium	-	-	+	-	?	N.T	?	+	
S.marcescens 1	-	-	+	-	?	N.T	-	+	
S.marcescens 2	-	-	?	-	-	N.T	?	+	
S.marcescens 3	-	-	+	-	-	N.T	?	+	
S.dysenteriae	-	-	-	-	-	N.T	-	+	

TABLA M-2: (continuación)

ESTIRPES	MEDIOS									
	A	B	C	ASN	ASNT	ATN	ATT	ARNP	AS	
Shigella sp.	-	-	-	-	-	-	N.T	-	+	
S .aureus CCB34	-	-	-	?	-	?	N.T	?	+	
S .aureus 1	-	-	-	+	-	+	N.T	+	+	
S .aureus 2	-	-	-	+	-	+	N.T	?	+	
S .faecium CCB19	?	-	?	+	-	+	N.T	+	+	
+ Crecimiento positivo	ATN Agar telurito nalidixico									
- Crecimiento negativo	ATT Agar azida trifeniltetrazolio									
? Crecimiento debil	ARNP Agar ramnosa nalidixico polimixina									
ASN Agar sangre nalidixico	AS Agar sangre									
ASNT Agar suero nalidixico tripaflavina	N.T No probado									

10.

Agar sangre ácido nalidíxico (Beerens y col., 19).-- Sobre este medio existe un crecimiento abundante por parte de todas las estirpes del género, dando lugar a colonias grandes de 1 a 2 mm de diámetro. A diferencia de las colonias sobre Agar sangre, son normalmente convexas aunque pueden aparecer planas o ligeramente prominentes y con los bordes regulares, siendo así mismo mucho menor la producción de pigmento de las distintas cepas (fotografía nº 13).

Al observar las colonias con luz incidente pueden apreciarse las típicas irisaciones (como tela de marfil) que se observan en todas las bacterias de este género (fotografía nº 14).

Es un medio poco selectivo, apareciendo los cultivos muy contaminados cuando el inóculo lo está; no obstante, si las colonias de listerias son suficientemente abundantes y están aisladas, se diferencian bastante bien del resto de la flora acompañante mediante la técnica de selección con luz incidente.

Las zonas de hemólisis no se observan con regularidad en este medio, pudiendo decir en líneas generales, que es un buen medio de trabajo.

Agar telurito potásico ácido nalidíxico (Khan, 180).-- También se obtienen crecimientos abundantes con este medio por parte de todas las estirpes del género. Las colonias son algo más pequeñas, entre 0,5 y 1,2 mm de diámetro, perfectamente circulares, convexas y con bordes lisos (fotografías números 15 y 17), existiendo una gran diversidad de tamaños en aquellas cepas que presenten más dificultades para crecer (fotografía números 16 y 18).

De color negro y brillante a simple vista, aparecen al observarlas a 35 ó 40 aumentos en lupa estereoscópica con luz incidente como colonias granuladas, dando la imagen de un raspador de cerillas.

No es un medio excesivamente selectivo, apareciendo -- con frecuencia otros tipos de colonias cuando partimos de inócu los muy contaminados. La diferenciación, por tanto, de las colo nias de listerias del resto de flora contaminante en estos ca-- sos, es una labor complicada, con la dificultad que ello impli ca para trabajar con un número elevado de muestras.

Agar ramnosa ácido nalidíxico polimixina B (Despierrez, 71).-- Medio de crecimiento abundante para todas las especies -- del género, dando lugar a colonias circulares bastante grandes, aproximadamente de 1 mm de diámetro, convexas, de bordes regula res, color blanco y aspecto mucoso (fotografías números 19 y -- 20).

Es un medio poco selectivo en el que aparecen los cul tivos frecuentemente contaminados, sobre todo por mohos y leva duras, cuando el inóculo no es muy puro. La diferenciación de - las colonias de listeria del resto de la flora contaminante es muy difícil, quedando supeditada a detalles macroscópicos (tama ño, color y forma), ya que al observarlas a la lupa con luz inci dente es muy difícil apreciar el aspecto trabeculado y las iri saciones propias del género. Irisaciones que, sin embargo, si/ se aprecian perfectamente a simple vista en la zona de la placa donde se produce un crecimiento confluyente en forma de tapiz. Al mover la placa delante de nosotros, de forma que la luz inci da oblicuamente, se observa en estos casos que el crecimiento - toma colores amarillo-verdoso-azulados.

Es un mal medio de trabajo para muestras contaminadas.

Medio de Slanetz y Bartley (44b).-- Aunque en princi pio este medio se utilizó como prueba fisiológica para observar la reducción del trifeniltetrazolio a formazán, y para compro-- bar la resistencia a crecer por parte de las listerias en dis-- tintas concentraciones de azida de sodio, puede llegar a - - -

emplearse como medio de aislamiento, debido a las características propias del crecimiento de los microorganismos del género - sobre este medio, siempre que se utilice a bajas concentraciones de azida de sodio (0,025%).

El crecimiento sobre este medio aparece en forma de colonias muy pequeñas, puntiformes, de menos de 0,5 mm de diámetro, de color rojo, convexas, aspecto mucoso, bordes lisos y regulares (fotografías números 21 y 22).

Al observarlas con lupa estereoscópica entre 30 y 40 aumentos se aprecian colonias blancas que tienen en su interior un punteado de color rojo, o unas partículas en forma de ramas/ de pino o cristales de nieve. Estas partículas pueden estar ocupando uniformemente toda la colonia o solamente el centro.

Crece en él todos los microorganismos del género, aunque crecen también otras bacterias contaminantes, sobre todo, - estreptococos del grupo D. También son frecuentes las contaminaciones por mohos.

Sin embargo, la diferenciación morfológica entre las colonias de listerias y las formadas por otros microorganismos, es bastante fácil, y puede emplearse como medio de aislamiento/ incluso en materiales muy contaminados.

Agar suero nalidíxico tripaflavina (Ralovich, 249).- - Sobre este medio sólo son capaces de crecer las especies L. monocytogenes y L. denitrificans, no multiplicándose en absoluto/ las especies L. grayi y L. murrayi, y haciéndolo de forma muy pobre algunas cepas de L. monocytogenes (el serotipo 5 de Ivanov, por ejemplo).

Las colonias son de un color amarillo intenso, circulares, de 1 mm aproximadamente de diámetro, convexas, mucosas y de bordes lisos y regulares (fotografías números 23 y 24).

En cultivos jóvenes se aprecia perfectamente la morfo-

logía típica de las colonias de microorganismos del género Listeria, al observarlas con lupa y luz incidente. Sin embargo, - cuando el cultivo envejece o la cepa tiene un crecimiento pobre, esta morfología se pierde.

Es un medio bastante selectivo, siendo muy pocos los - gérmenes contaminantes que son capaces de crecer. Tiene como - único inconveniente que las colonias son del mismo color que el medio, por lo que resaltan poco sobre el fondo a la hora de observarlas en la lupa y hacen penosa la labor de selección.

En líneas generales, podemos decir que es un medio bastante bueno cuando se pretenden aislar microorganismos de las especies L. monocytógenes y L. denitrificans.

Medio de aislamiento A.- Es un medio que no permite - el crecimiento de algunas estirpes de las especies L. grayi y L. murrayi, algunas cepas de L. monocytógenes y L. denitrificans lo hacen de manera atípica, presentando un gran dimorfismo entre las colonias (fotografía nº 27). No obstante, puede - decirse que todas las cepas de las cuatro especies, cuando crecen, son perfectamente identificables por sus características -- morfológicas.

El crecimiento de las cepas suele ser abundante, con/ colonias circulares, de 1 mm aproximadamente de diámetro, convexas, mucosas, brillantes, de bordes lisos y regulares. El color es de un amarillo intenso, presentando a la observación con lupa binocular a 40 aumentos el trabeculado propio del género/ (fotografías números 25 y 26).

Es un medio bastante selectivo, aunque suelen aparecer contaminaciones si existen en el inóculo, pero en el que se diferencian bien las colonias de listerias del resto de la flora, re saltando éstas perfectamente sobre el fondo rojo.

En líneas generales, podemos decir que es un medio bastante

tante apropiado para aislar las especies L. monocytógenes y L. denitrificans y de menor efectividad para las especies L. grayi y L. murrayi, aunque nosotros las aislamos regularmente.

Medio de aislamiento B.- Más selectivo que el anterior, sólo permite aislar regularmente las especies L. monocytógenes y L. denitrificans.

Las colonias presentan una morfología muy parecida al caso anterior, con un color amarillo limón que contrasta perfectamente con el fondo rojo, circulares, de un diámetro aproximadamente de 1 mm, tienden a ser más planas que sobre el medio A, aunque aparecen algunas estirpes (sobre todo de la especie/ L. denitrificans) como prominentes. Los bordes de las colonias son lisos y regulares y el aspecto sigue siendo mucoso (fotografías números 28 y 29).

La observación a la lupa estereoscópica sigue dando la imagen de las colonias típicas del género.

Medio muy selectivo; no permite el crecimiento de muchos contaminantes, aún con inóculos de heces, y su utilización puede estar recomendada para el aislamiento de L. monocytógenes y L. denitrificans.

Medio de aislamiento C.- Es un medio no excesivamente selectivo; permite el crecimiento de todas las estirpes de L. monocytógenes y L. denitrificans, y bastantes de L. grayi y L. murrayi.

Este medio brinda gran cantidad de información a la hora de practicar los aislamientos, debido a su especial composición. Siendo, además, la morfología de las colonias muy típica; circulares, como de 0,5 mm de diámetro, planas o convexas, con bordes que tienden a ser lisos, con formas más o menos irregulares, aspecto mucoso y de un color verde amarillento al observarlas a simple vista (fotografías números 30 y 31).

Con lupa estereoscópica a 40 aumentos se observa una morfología de colonias muy típica con el punteado iridiscente propio del género, en colores azul, verde y amarillo (fotografía nº 32).

El crecimiento se retrasa, al igual que en los casos anteriores, a 48-72 horas tras la incubación a 22°C y conforme aparece se observa un ennegrecimiento alrededor de las colonias de listerias (por hidrólisis de la esculina) que posteriormente se va difundiendo al resto de la placa.

No es excesivamente selectivo, creciendo algunos contaminantes cuando los aislamientos se efectuaron a partir de heces. Ahora bien, a pesar de esta circunstancia, si la siembra de las placas se hace lo suficientemente extensa para que crezcan las colonias aisladas, es posible distinguirlas de sus contaminantes, incluso a simple vista.

Por tanto, resumiendo lo anteriormente expuesto, podemos afirmar que este medio es un buen medio de aislamiento para todas las especies del género, incluso L. grayi y L. murrayi -- aunque su máxima eficacia la muestra con las especies L. monocytogenes y L. denitrificans.



MEDIOS	COLONIAS			ALTERACION. INDUCID. POR LISTERIAS	SELECTIV.	DIFERENCIAC DE LIST. y CONT.	OBSERVAC. a. b. c. d.
	TAMAÑO	FORMA	COLOR				
A	-----	-----	-----	ENTURBIAMIE.	NINGUNA	-----	+ + + 0
B	-----	-----	-----	ENTURBIAMIE.	NINGUNA	-----	+ 0 + 0
C	-----	-----	-----	ENNEGRECIM.	NINGUNA	-----	0 + + +
APR	-----	-----	-----	ENTURBIAMIE..	NINGUNA	-----	+ 0 + 0
CTF	-----	-----	-----	ENTURBIAMIE.	NINGUNA	-----	+ 0 + 0
CTFN	-----	-----	-----	ENTURBIAMIE.	POCO	-----	+ 0 + 0
A	-----	-----	-----	AZUL-AMARIL.	BUENA	-----	0 + + +
B	-----	-----	-----	AZUL-INCOLO.	BUENA	-----	0 + + +
C	-----	-----	-----	ENNEGRECIM.	BUENA	-----	+ + + +
PNPA	-----	-----	-----	REDUC.AZU.M.	EXCESIV.	-----	- - - 0

TABLA M3: ASPECTO DE LOS CULTIVOS SOBRE LOS DISTINTOS MEDIOS

APR : Agua de peptona ramnosa . CTFN : Caldo triptosa fosfato ácido nalidixico.

CTF : Caldo triptosa fosfato. PNPA : Agua de peptona ramnosa polimixina B azul de metileno.

MEDIOS	COLONIAS			ALTERACION. INDUCID. POR LISTERIAS	SELECTIV.	DIFERENCIAC. DE LIST. CONT.	OBSERVAC. a. b. c. d.
	TAMAÑO	FORMA	COLOR				
A	1 mm	CONVEX.	AMARIL.	-----	BUENA	FACILMENT.	0 0 + +
B	1 mm	P.CONV.	AMARIL.	-----	EXCESIVA	FACILMENT.	- 0 + +
C	0,5 mm	P.CONV.	VERDOS.	ENNEGRECIMI.	BUENA	MUY FACIL.	+ + + +
A S N	1-2 mm	CONVEX.	PROPIO	HEMOLISIS	REGULAR	FACILMENT.	+ - + +
A S N T	1 mm	CONVEX.	AMARIL.	-----	EXCESIVA	FACILMENT.	- - + +
A T N	0,5-1 mm	CONVEX.	NEGRAS	-----	REGULAR	DIFÍCIL	+ 0 0 0
A R P N	1 mm	CONVEX.	BLANCAS	-----	POCO SEL.	MUY DIFÍC.	+ - - -
A T T	0,5 mm	CONVEX.	ROJAS	-----	EXCESIVA	FACILMENT.	- 0 + +
A S	1-2 mm	P.CONV.	PROPIO	HEMOLISIS	NO SELEC.	FACILMENT.	+ - + 0

TABLA M3: ASPECTO DE LOS CULTIVOS SOBRE LOS DISTINTOS MEDIOS

a. :crecimiento      c. :selección de colonias      + :buena      - :mala  
b. :selectividad      d. :información      0 :normal

### V.3. ESTUDIOS DE RESISTENCIA

#### V.3.1. Acriflavina ClH

Los resultados sobre la capacidad de crecimiento de las distintas cepas ensayadas sobre el medio Agar suero nalidixico/tripaflavina (Ralovich, 249), al que se le iban añadiendo cantidades crecientes de acriflavina (desde 10 mg/l hasta 50 mg/l), vienen expresados en la tabla T-1, en la que se pueden observar en primer lugar el resultado sobre la positividad de los crecimientos a las distintas concentraciones de las 23 cepas patrón de nuestra colección.

En la parte inferior de la tabla queda indicado el número de cepas que crecían a cada concentración del total de las 25 estirpes de L. monocytogenes, 15 de L. grayi, 3 de L. murrayi y 1 de L. denitrificans procedentes de coprocultivos de ganado ovino y bovino y que también hemos ensayado.

Todas las cepas de L. monocytogenes y L. denitrificans ensayadas, soportan perfectamente hasta 40 mg/l de acriflavina.

Un 27,7% de las cepas de L. monocytogenes tienen dificultades para crecer con 50 mg/l de acriflavina, ya que si bien se desarrollan colonias, éstas son muy escasas, pequeñas y totalmente atípicas, no pudiendo observarse en ellas irisaciones/típicas del género.

Ninguna de las cepas patrón de L. grayi fué capaz de crecer a la más baja concentración probada (10 mg/l). Sin embargo, sorprendentemente, de todas las cepas aisladas por nosotros un 93,3% de L. grayi y un 100% de L. murrayi crecieron en presencia de 10 mg/l de acriflavina.

Con la especie L. murrayi sucede algo parecido; una de las cepas patrón (procedente de la colección de Seeliger) no -

TABLAT-1 : CRECIMIENTO EN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ACRIFLAVINA ClH.

Cepa	ACRIFLAVINA ClH mg/l				
	10	20	30	40	50
L. denitrificans (Se.)	+	+	+	+	+
L. grayi (Se.)	-	-	-	-	-
L. grayi (Iv.)	-	-	-	-	-
L. monocytt. (Se.) 1/2a	+	+	+	+	?
L. monocytt. (Se.) 1/2b	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 1/2c	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 3a	+	+	+	+	?
L. monocytt. (Se.) 3b	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 3c	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 4a	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 4ab	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 4b	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 4c	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 4d	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 4e	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 5	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Se.) 7	+	+	+	+	+
L. monocytt. (Iv.) 1/2a	+	+	+	+	?
L. monocytt. (Iv.) 4b	+	+	+	+	?
L. monocytt. (Iv.) 5	+	+	+	+	?
L. monocytt. (Iv.) 6	+	+	+	+	+
L. murrayi (Se.)	-	-	-	-	-
L. murrayi (Iv.)	+	-	-	-	-
25 L. monocytt. no serot.	25	25	25	25	25
15 L. grayi no serot.	14	0	0	0	0
3 L. murrayi no serot.	3	1	0	0	0
1 L. denitrificans no serot.	1	1	1	1	1
TOTAL	63	46	45	45	45
%	94,0	68,6	67,1	67,1	67,1

fué capaz de crecer en esta proporción de acriflavina, sin embargo, la procedente de la colección de Ivanov y todas las aisladas por nosotros, lo hicieron perfectamente a esta concentración, e incluso hubo un 20% que crecieron con 20 mg/l de tripaflavina.

La concentración media teórica que permitirá crecer a todas las especies del género sería de 31,3, siendo la varianza igual a 300,3, la desviación tipo de 17,3 y el error standard / 2,1. Por tanto, para un coeficiente de seguridad del 95%, el intervalo de confianza de la media estaría en  $\pm 4,32$  mg/l.

#### V.3.2. Acido nalidixico y tripán azul

Los resultados de las pruebas sobre la capacidad de crecimiento de las distintas cepas patrón de nuestra colección, sobre medios que contenían estas dos sustancias a distintas concentraciones, fueron los siguientes:

De las 30 cepas de L. monocytogenes que probamos (18 procedentes de colección y serotipadas y 12 aisladas por nosotros a partir de coprocultivos) todas fueron capaces de crecer a la máxima concentración probada de estas dos sustancias. Así, se observaba un perfecto crecimiento a las 24 horas con concentraciones de 50 mg/l de ácido nalidixico y 100 mg/l de tripán azul, incluso cuando estas dos sustancias se añadían conjuntamente a estas concentraciones.

Tampoco se observó pérdida de la capacidad patógena de las cepas en que se probó, ni ningún otro tipo de alteración.

El mismo comportamiento fue observado en las dos cepas de L. denitrificans ensayadas (una de colección y otra procedente de coprocultivo). Sin embargo, las cepas de L. grayi y L. murrayi a partir de los 80 mg/l de tripán azul comienzan a en-

lentecer su crecimiento, hasta el punto que de las 17 cepas de L. grayi ensayadas (2 de colección y 15 de coprocultivos), 6 de ellas (35,2%) no son capaces de crecer cuando al medio se le -- adicionan 100 mg/l de tripán azul y 50 mg/l de ácido nalidíxi-- co. Recuperándose, no obstante, al resembrarlas sobre Agar san-- gre tras una semana de incubación en estos medios. Estas con-- centraciones, por tanto, no son suficientes para producir la -- muerte de estas bacterias, por lo menos al pH al que se encon-- traban los medios (7,3).

Con las 5 cepas de L. murrayi probadas (2 de colección y 3 de coprocultivo) sucede algo parecido; si bien son capaces/ de crecer todas, incluso a las concentraciones máximas (100 mg/l y 50 mg/l). Sin embargo, lo hacen de una forma un tanto atípi-- ca, prolongándose bastante los tiempos de incubación.

Cuando el azúcar que lleva incorporado el medio de cul-- tivo no es atacado por la cepa probada (caso de la Rammosa), -- aparecen signos evidentes de crecimiento (enturbiamiento del me-- dio, depósitos, etc.) y sin embargo, no se produce la reducción del tripán azul y el medio no pierde su color original.. Este -- fenómeno que se produce en L. grayi y L. murrayi no aparece en/ L. monocytogenes y L. denitrificans, en las que si bien la re-- ducción no es total, como en los casos en que el azúcar es fácil-- mente fermentado, hay una pérdida evidente del color azul origi-- nal virando a una tonalidad pardusca, como puede apreciarse en/ la fotografía nº 3.

Por tanto, con concentraciones de ácido nalidíxico y -- tripán azul de 50 mg/l y 80 mg/l respectivamente, se ha conse-- guido el crecimiento del 100% de las cepas del género, incluso/ cuando estas sustancias se han añadido conjuntamente.

### V.3.3. Azida de sodio y trifeniltetrazolio

Los resultados sobre la capacidad de crecimiento en -- presencia de azida sódica de los microorganismos del género Listeria, muestran así mismo, bastante uniformidad entre todas las especies del género.

Tras probar el mismo grupo de bacterias patrón que en/ los casos anteriores (18 cepas de L. monocytogenes, 2 de L. grayi, 2 de L. murrayi y 1 de L. denitrificans), observamos que a/ la concentración del 0,025% de azida de sodio en todas las -- siembras había crecimiento al cabo de 48-96 horas. Apareciendo unas colonias pequeñas, puntiformes, de menos de 0,5 mm de diámetro y de un color rojo intenso, que a la lupa binocular muestran como un entramado arborescente por reducción del trifeniltetrazolio del medio. Extemporáneamente se observan colonias -- de mayor tamaño hasta de más de 1 mm de diámetro.

Con una concentración de 0,05% de azida sódica crecen/ también todas las cepas, si bien el crecimiento a simple vista/ es prácticamente inapreciable, constatándose éste únicamente -- porque la zona inoculada toma el aspecto como de un tapiz rojo. En este tapiz aparecen unas colonias pequeñísimas, blancas o -- transparentes en sus extremos, al ser observadas con lupa entre 30 y 50 aumentos, y un trabeculado o punteado rojo en el centro por reducirse el tetrazolio. Únicamente una cepa de L. grayi/ no creció a esta concentración, precisamente la procedente de -- la colección remitida por Seeliger.

Al aumentar la concentración al 0,1% no se observó crecimiento en ninguna de las cepas probadas. A lo sumo aparecía/ una tenue coloración rojiza sobre el medio en la zona donde se/ había efectuado el inóculo. Sin embargo, en ningún momento nos -- fué posible apreciar la formación de colonias ni siquiera valién

donos de la lupa binocular.

En la experiencia que efectuamos con las 220 cepas procedentes de coprocultivos sobre el medio de Slanetz y Bartley, - conteniendo azida de sodio y trifenil tetrazolio al 0,01%, se observó que todas las cepas fueron capaces de crecer reduciendo el trifeniltetrazolio. Unicamente en 12 de ellas (5,45%), el crecimiento fué de un aspecto más pobre de lo habitual, dando lugar en las primeras estrías, donde el inóculo fué más fuerte, a colonias muy pequeñas y con gran dimorfismo. En el resto de la placa no fuimos capaces de observar crecimiento.

#### V.3.4. Bilis al 40%

Todas las cepas probadas de las distintas especies del género Listeria, fueron capaces de crecer en un medio que contenía un 40% de bilis de buey, apareciendo, además, las colonias perfectamente trabeculadas y de tamaño y textura normal. Al microscopio óptico tampoco se observó ningún tipo de alteración, ni siquiera en el tamaño o capacidad tintorial de los gérmenes.

#### V.3.5. Cloruro sódico

Los resultados de las pruebas realizadas sobre la capacidad de crecimiento de las distintas estirpes de listeria sobre medios de cultivo con altas concentraciones de cloruro sódico pueden apreciarse en la tabla Cl-1. En ella pueden observarse los resultados de cada uno de los cultivos de las cepas patrón de nuestra colección sobre cada una de las concentraciones, así como los resultados totales de los crecimientos positivos (a cada una de las concentraciones) de las 25 estirpes de L. monocytogenes, 15 de L. gravi, 3 de L. murravi y 1 de L. de-



TABLA C1-1: CRECIMIENTO EN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO SODICO.

Cepa	PORCENTAJE DE CLORURO SODICO						
	10	9	8	7	6	5	4
L. denitrificans (Se.)	-	-	+	+	+	+	+
L. grayi (Se.)	-	-	-	-	-	+	+
L. grayi (Iv.)	-	-	+	+	+	+	+
L. monocytt. 1/2a (Se.)	+	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 1/2b (Se.)	-	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 1/2c (Se.)	-	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 3a (Se.)	-	-	-	+	+	+	+
L. monocytt. 3b (Se.)	-	-	-	-	-	+	+
L. monocytt. 3c (Se.)	+	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 4a (Se.)	-	-	-	+	+	+	+
L. monocytt. 4ab (Se.)	-	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 4b (Se.)	+	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 4c (Se.)	+	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 4d (Se.)	-	-	+	+	+	+	+
L. monocytt. 4e (Se.)	+	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 5 (Se.)	+	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 7 (Se.)	-	-	+	+	+	+	+
L. monocytt. 1/2a (Iv.)	-	+	+	+	+	+	+
L. monocytt. 4b (Iv.)	-	-	+	+	+	+	+
L. monocytt. 5 (Iv.)	-	-	+	+	+	+	+
L. monocytt. 6 (Iv.)	-	-	-	-	-	+	+
L. murrayi (Se.)	-	+	+	+	+	+	+
L. murrayi (Iv.)	-	-	+	+	+	+	+
25 L. monocytt. no serot.	3	4	15	17	22	25	25
15 L. grayi no serot.	0	0	7	10	14	15	15
3 L. murrayi no serot.	0	0	2	2	3	3	3
1 L. denitrificans no serot.	0	1	1	1	1	1	1
TOTAL	9	16	43	50	60	67	67
%	13,4	23,8	64,1	74,6	89,5	100	100

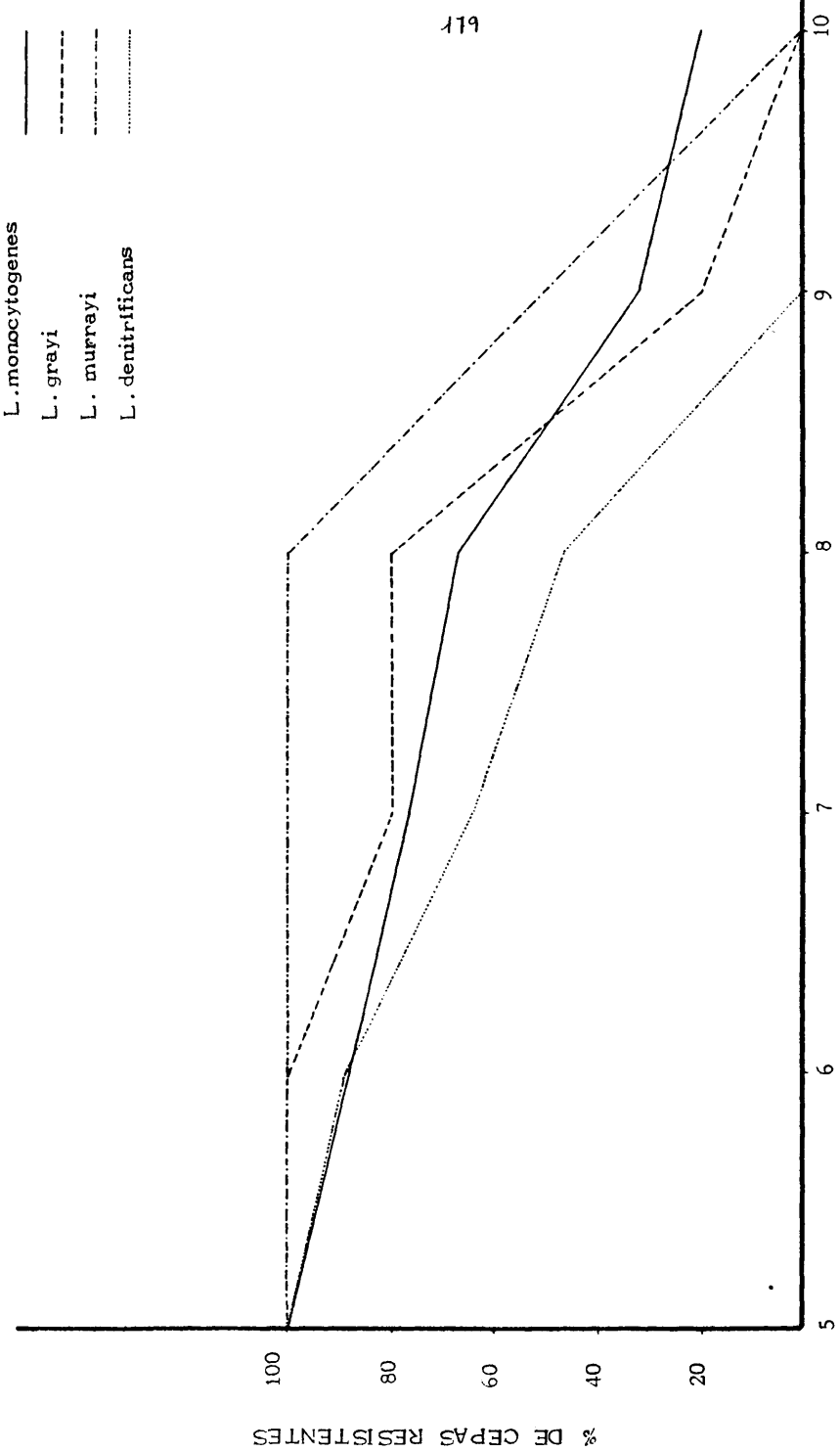


FIGURA CL-1: RESISTENCIA POR PARTE DE LAS LISTERIAS A CRECER EN ALTA CONCENTRACION DE CI Na.

nitrificans de origen ovino y bovino que también fueron probadas.

En la figura C1-1 puede observarse la representación de los distintos porcentajes de estirpes de cada una de las especies del género que ha sido capaz de crecer en una concentración determinada de cloruro sódico.

Si calculamos el valor medio de la concentración y la estimación de su intervalo de confianza, encontramos un valor medio para el crecimiento de las distintas cepas del 6,62% de cloruro sódico, con una varianza  $V = 1,97$  y una desviación tipo  $= 1,40$ , calculando a partir de aquí el error standard observamos que éste es igual a 0,08 y por tanto, para un coeficiente de seguridad del 95% nos encontramos con un valor del intervalo igual a  $\pm 2 \cdot 0,08 = \pm 0,16$ ; luego, teóricamente, el 95% de las estirpes del género nos deben en una concentración de cloruro sódico que oscile entre  $6,62 \pm 0,16$ .

#### V.3.6. Polimixina B

La capacidad de crecimiento de las listerias sobre medios de cultivo que contuvieran polimixina B, se verificó sobre 3 medios que básicamente tenían la misma composición, ya que sólo se diferenciaban en el carbohidrato que se les añadía, y así:

- El medio Ap contenía glucosa
- El medio Bp contenía ramnosa
- El medio Cp no contenía azúcar

En estos tres medios, se probaron todas las cepas de L. monocytogenes existentes en nuestra colección, quedando expresados en la tabla P-1 los resultados de las cepas que crecieron en cada uno de los medios y a cada una de las concentraciones.

nes ensayadas.

Igualmente, se probaron sobre el medio Ap, 12 cepas de L. monocytogenes, 12 de L. grayi, 3 de L. murrayi y 1 de L. denitrificans, todas sin serotipar y aisladas en heces de ganado ovino y bovino en el transcurso de la experiencia.

En la tabla P2 están expresados los resultados desglosados por especies, y los distintos porcentajes del número de estas cepas que creció en el medio Ap, cuando se utilizaron distintas concentraciones de polimixina B.

La concentración máxima de polimixina B en la que se obtuvo crecimiento fue  $9,87 \cdot 10^6$  UI/l, obteniendo un valor medio para la concentración a la que crecen las 30 cepas de L. monocytogenes ensayadas de  $3,3 \cdot 10^6$  UI/l, una varianza de  $6,3 \cdot 10^{12}$  UI, una desviación tipo de  $2,5 \cdot 10^6$  UI y un error standard de  $4,7 \cdot 10^5$  UI, siendo por tanto para un coeficiente de seguridad del 95% el intervalo de confianza igual a  $\pm 9,6 \cdot 10^5$  UI/l; por tanto, podemos esperar que el 95% de las cepas de L. monocytogenes que muestreemos teóricamente deberían crecer en concentraciones de polimixina B que oscilen entre  $2,44 \cdot 10^6$  y  $4,36 \cdot 10^6$  UI por litro.

En las figuras de P-1 a P-3 puede observarse, por su perposición, los distintos porcentajes de cada una de las cepas que crecen a distintas concentraciones de polimixina B en el medio que contenía glucosa, comprobándose perfectamente como L. grayi parece ser, a priori, la más resistente a este inhibidor.

#### V.3.7. Telurito potásico

Los resultados de las pruebas de resistencia en medios de cultivo con altas concentraciones de telurito potásico por parte de las 23 cepas patrón de nuestra colección, además de 12

U.I./I MEDIOS	19,75.10 <sup>6</sup>	9,875.10 <sup>6</sup>	5,925.10 <sup>6</sup>	1,975.10 <sup>6</sup>	7,9.10 <sup>5</sup>	3,95.10 <sup>5</sup>	1,975.10 <sup>5</sup>
A	NINGUNA	Se 4c Iv. 6	Se 1/2b Se 3b Se 7	TODAS EXCEPTO Iv. 5	TODAS	TODAS	TODAS
B	NINGUNA	NINGUNA	Se. 3b Iv. 6	Se. 4c Iv. 5 Se. 1/2b Iv. 4b Se. 4a Se. 4d Se. 4e Se. 7	TODAS	TODAS	TODAS
C	NINGUNA	NINGUNA	NINGUNA	Se. 3b Se. 4e	Se. 1/2a Se. 1/2b Se. 4c Se. 4d Se. 4e Se. 7 Iv. 4b	TODAS EXCEPTO Iv. 5	TODAS

TABLA P1: CEPAS DE *L. monocytogenes* QUE CRECEN EN PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE POLIMIXINA B EN LOS DISTINTOS MEDIOS.

CEPAS	Nº	$19,75 \cdot 10^6$ UI/l	$9,875 \cdot 10^6$	$5,925 \cdot 10^6$	$1,975 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^5$
L. monocytogenes Serotipadas	18	0	11,1%	27,7%	94,4%	100%
L. monocytogenes Bovino	5	0	0	40%	80%	100%
L. monocytogenes Ovino	7	0	0	42,8%	100%	100%
L. grayi Ovino	15	0	73,3%	100%	100%	100%
L. murrayi Ovino	3	0	33,3%	33,3%	100%	100%
L. denitrificans Ovino	1	0	0	100%	100%	100%
TOTAL	49	0	28,5%	55,10%	95,9%	100%

TABLA P2: PORCENTAJES DE DISTINTAS LISTERIAS QUE CRECEN A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE POLIMIXINA B EN EL MEDIO Ap.

L. monocytogenes Tipo  
 L. monocytogenes (BOVINO)  
 L. monocytogenes (OVINO)

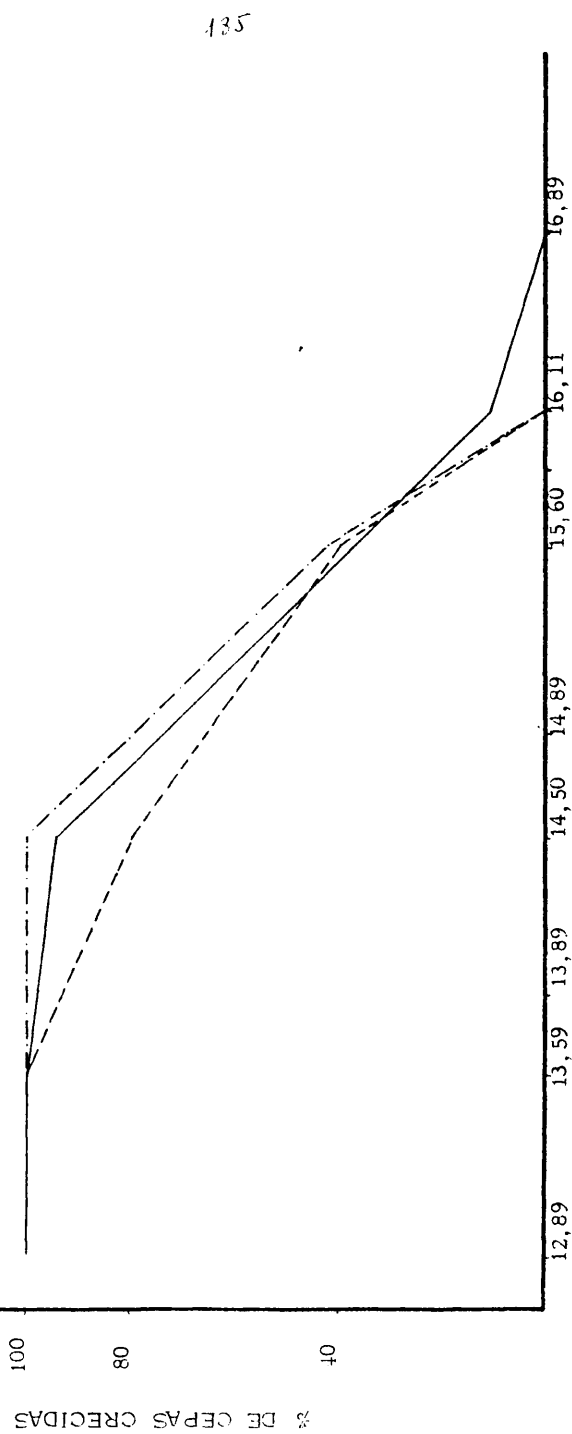


FIGURA P1 : PORCENTAJE DE CEPAS DE L. monocytogenes QUE CRECEN EN EL MEDIO AP A DISTINTAS  
 CONCENTRACIONES DE POLIMIXINA B

L. grayi  
 L. denitrificans  
 L. murrayi

186

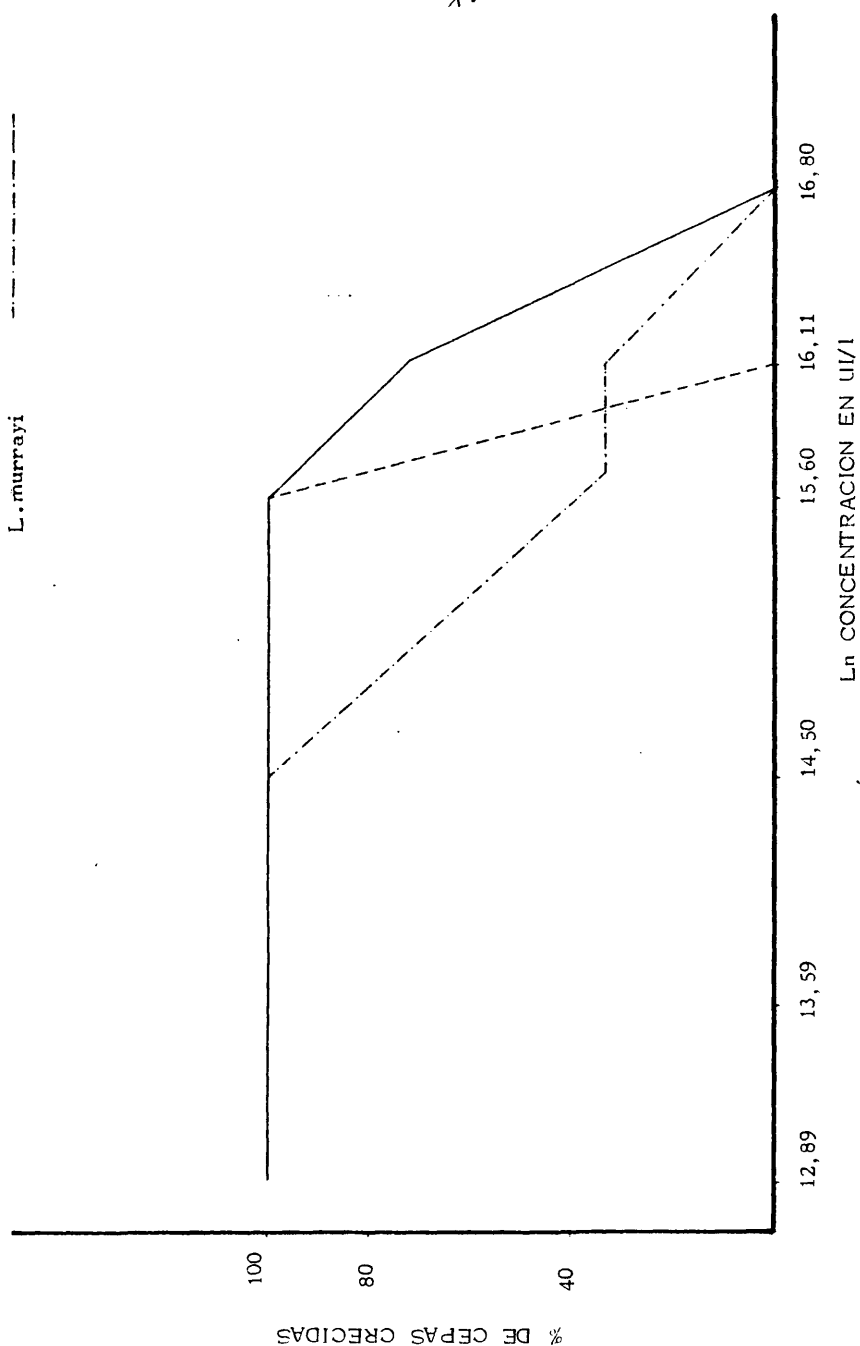


FIGURA P2: PORCENTAJE DE MICROORGANISMOS DE *L. grayi* *L. murrayi* Y *L. denitrificans* QUE CRECEN A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE POLIMIXINA B EN EL MEDIO A p.



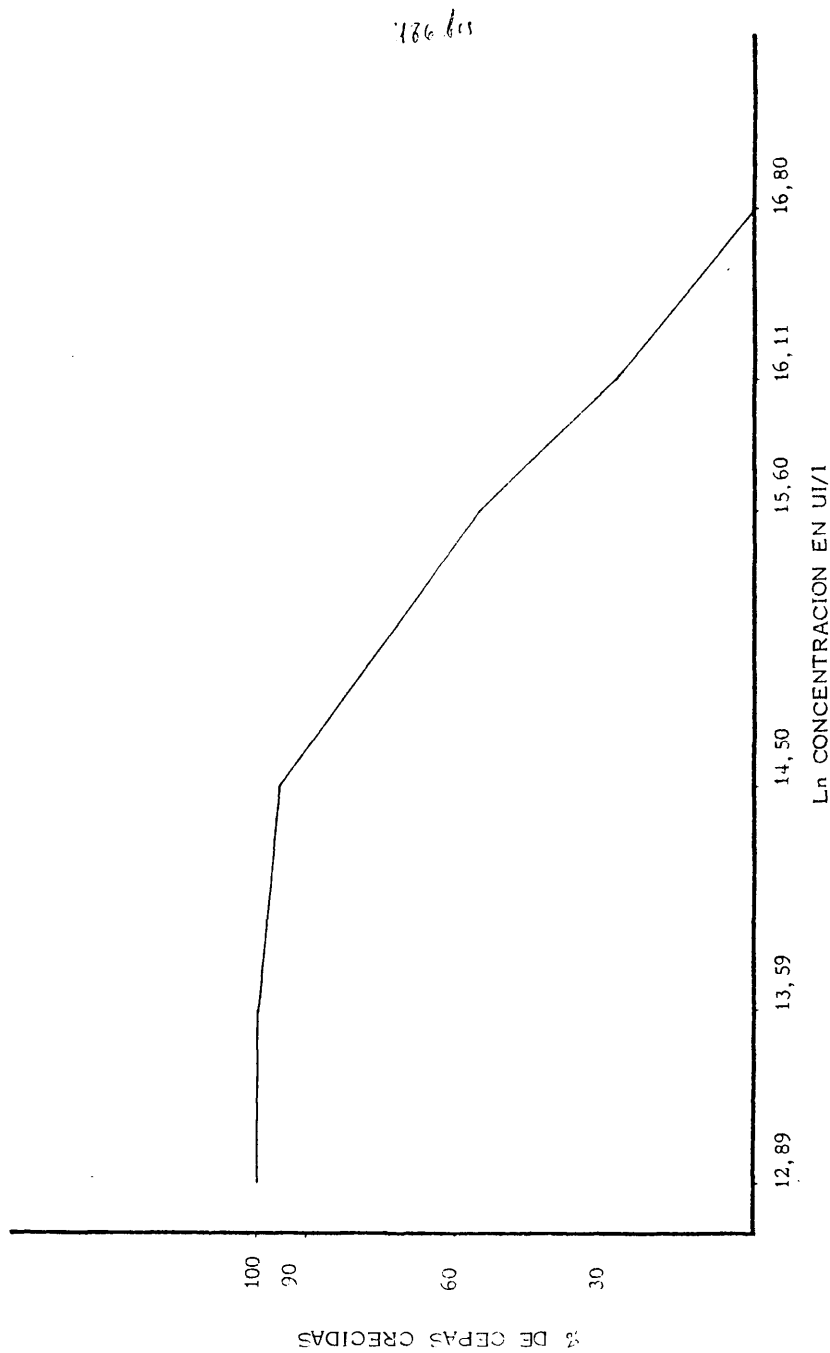


FIGURA P3: PORCENTAJE DE MICROORGANISMOS DEL GENERO LISTERIA QUE CRECEN A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE POLIMIXINA B EN EL MEDIO Ap.

cepas de L. monocytogenes, 15 de L. grayi, 3 de L. murrayi y 1/ de L. denitrificans sin serotipar y procedentes de heces de ganado ovino y bovino, no pueden ser más concluyentes.

Todas las cepas sin excepción, fueron capaces de crecer a la concentración más alta de telurito potásico ensayada - (0,1%) en 48 horas, reduciendo al mismo tiempo la sal y apareciendo por tanto, las colonias de color negro.

Unicamente conviene reseñar que, si bien hubo cepas, - sobre todo de L. monocytogenes y L. denitrificans, que crecieron perfecta y abundantemente a esta concentración, otras sin embargo, lo hacían de forma más escasa y con gran dimorfismo entre las colonias (fotografía nº 18), apareciendo colonias punti- formes al lado de otras de textura y aspecto normal. Entre las cepas que presentaban esta característica figuran las L. monocytogenes serotipo 5, L. grayi procedente de la colección del profesor Seeliger y 2 cepas de L. murrayi. Por contra 2 cepas de L. monocytogenes y una de L. denitrificans que se probaron esporádicamente a concentraciones más altas, fueron capaces de crecer hasta con una concentración del 0,35% de telurito potásico.

#### V.4. DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

A continuación pasamos a exponer los resultados del estudio bioquímico de las 220 cepas aisladas a lo largo de toda la experiencia.

En principio y para comprobar su posible encuadre en el género, se realizaron en todas las colonias seleccionadas -- las siguientes pruebas (tabla B-1), con los resultados que se exponen en la misma tabla.

<u>PRUEBAS</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>Positivas</u>	<u>%</u>
Esculina	220	220	100
Catalasa	220	220	100
Gram	220	220	100
Oxidasa	220	0	0
Rojo de metilo	220	220	100
Indol	220	0	0
beta-Galactosidasa	220	2	0,9

Tabla B-1

A continuación, como pruebas confirmativas de su correcto encuadre genérico y como una primera clasificación provisional por especies, se realizaron las siguientes pruebas (tabla B-2):

<u>PRUEBAS</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>Positivas</u>	<u>%</u>
Voges-Proskauer	220	210	95,4
Reduccion de nitratos	220	20	9,09
Fermentación de la glucosa	220	220	100
Fermentación del manitol	220	94	42,7
Movilidad	220	219	99,5

Tabla B-2

En la tabla B-3 exponemos los resultados de diversas -  
pruebas fisiológicas, bioquímicas y de patogenicidad realizadas  
para la caracterización de las distintas cepas.

<u>PRUEBAS</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>Positivas</u>	<u>%</u>
Reducción del azul de metileno 0,1%	220	220	100
Crecimiento en bilis 40%	220	220	100
Acidificación de la leche tornasolada	220	197	89,5
Crecimiento en telurito potásico 0,05%	220	220	100
Crecimiento en azida sódica 0,01%	220	220	100
Crecimiento en cloruro sódico 6%	67	60	89,5
Crecimiento en suero de Loeffler	220	220	100
Licuación del suero de Loeffler	220	0	0
Hidrólisis del almidón	220	0	0
Hemólisis	176	13	7,3
Patogenicidad para el ratón	116	60	51,7
Reducción del trifeniltetrazolio	220	220	100

Tabla B-3

Finalmente, comprobamos el metabolismo glucídico de las distintas cepas, observando la producción de ácido a partir de/ los azúcares y alcoholes enumerados en la tabla B-4.

<u>GLUCIDOS</u>	<u>Nº Cepas</u>	<u>Positivas</u>	<u>%</u>
Adonitol	121	0	0
Almidón	120	95	79,1
Amigdalina	120	120	100
Arabinosa	120	22	18,3
Celobiosa	141	141	100
Dextrina	120	106	88,3
Dulcitol	119	2	1,6
Fructosa	120	120	100
Galactosa	120	66	55
Glucógeno	110	6	5,4
Inositol	141	2	1,4
Lactosa	169	152	89,9
Maltosa	141	141	100
Manosa	141	141	100
Melecitosa	121	48	39,6
Melobiosa	73	5	6,8
Rafinosa	141	5	3,5
Ramnosa	146	87	59,5
Sacarosa	120	67	55,8
Salicina	132	132	100
Sorbitol	N.T	N.T	N.T
Trehalosa	141	140	99,2
Xilosa	119	68	57,1

Tabla B-4

En la tabla queda reflejado, el número de cepas, así como el porcentaje de ellas que fueron capaz de producir acidificación tras 21 días de incubación

Con objeto de clasificar las 220 cepas de listerias -- aisladas en este estudio, confeccionamos el esquema reflejado -- en la tabla B-5. Para su elaboración utilizamos los datos suministrados por Bergey's Manual (43), Seeliger y col. (284), Kampelmacher y col. (175), Cooper y col. (53), Cottin y col. (56b) y Wilkinson y col. (323b).

	<u>L.monocyt.</u>	<u>L.grayi</u>	<u>L.murrayi</u>	<u>L.denitrific.</u>
Gram	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	+
Rojo de metilo	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-
beta-Galactosidasa	Nc.	Nc.	Nc.	Nc.
Voges-Proskauer	+	+	+	-
Reducción de nitratos	-	-	+	+
Fermentación de la glucosa	+	+	+	+
Fermentación del manitol	-	+	+	-
Movilidad	+	+	+	+
Reducción del azul de metileno	+	+	+	+
Crecimiento en bilis al 40%	+	+	+	+
Reducción del trifeniltetrazolio	+	+	+	+
Acidificación de la leche tornasolada	+	+	+	+
Crecimiento en telurito potásico 0,05%	+	+	+	+
Crecimiento en azida de sodio 0,01%	+	+	+	Nc.
Hidrólisis de la urea	-	-	-	-
Hemólisis	+	-	-	-
Patogenicidad para el ratón	+	-	-	-

Tabla B-5

	<u>L.monocyt.</u>	<u>L.grayi</u>	<u>L.murrayi</u>	L denitrifi
Producción de				
ácido a partir de:				
Adonitol	-	-	-	-
Almidón	+	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+
Arabinosa	-	-	-	+
Celobiosa	+	+	+	+
Dextrina	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-
Fructosa	+	+	+	+
Galactosa	d	+	(+)	+
Glucógeno	-	-	-	+
Inositol	-	-	-	-
Lactosa	(d)	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+
Melecitosa	d	-	-	-
Melobiosa	-	-	-	(+)
Rafinosa	-	-	-	-
Ramnosa	d	-	d	-
Sacarosa	d	-	-	+
Salicina	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+
Xilosa	-	-	-	+

Tabla B-5 (Continuación)

+ : positivo , - : negativo , d : variable , ( ) : reacción lenta

Con arreglo a este esquema las 220 estirpes quedan clasificadas en las cuatro especies del género, con los porcentajes que aparecen expresados a continuación en la tabla B-6.

	<u>Nº</u>	<u>%</u>
Total de cepas aisladas .....	220	100
Total de cepas <i>L.monocytogenes</i> .....	118	53,6
Total de cepas <i>L.grayi</i> .....	82	37,2
Total de cepas <i>L.murrayi</i> .....	12	5,4
Total de cepas <i>L. denitrificans</i> .....	8	3,6

Tabla B-6

A partir de estos datos confeccionamos las tablas B-7, B-8, B-9 y B-10, en las cuales se reflejan los resultados de las pruebas bioquímicas para cada una de las especies de Listeria.

No se realizaron todas las pruebas bioquímicas, sobre todo de acidificación de azúcares, en todas las cepas, ya que cuando una cepa quedaba encuadrada sin dudas en una determinada especie, no se siguieron realizando más pruebas.

Por último, se han confeccionado los polígonos de frecuencias de las pruebas bioquímicas con respecto a los porcentajes de cepas de cada una de las especies que hemos probado, quedando éstos reflejados en los gráficos B-1, B-2, B-3 y B-4, y que por transparencia pueden ser comparados entre sí.

Conviene resaltar la respuesta uniforme que hemos obtenido por todas las especies del género en las pruebas de catalasa, movilidad, rojo de metilo, Voges-Proskauer, fermentación de la glucosa, hidrólisis de la esculina y acidificación de manosa, fructosa, amigdalina, maltosa, celobiosa y salicina, con un 100% de resultados positivos; y en las pruebas de oxidasa, beta-galactosidasa, producción de indol y acidificación del ado



	<u>Nº Cepas</u>	<u>Positivas</u>	<u>%</u>
Voges Proskauer	118	116	98,3
Rojo de metilo	118	118	100
Reducción de nitratos	118	0	0
Indol	118	0	0
Glucosa	118	118	100
Manitol	118	0	0
Esculina	118	118	100
Adonitol	66	0	0
Almidon	65	46	70,7
Amigdalina	65	65	100
Arabinosa	65	7	10,76
Celobiosa	86	85	98,8
Dextrina	65	54	83
Dulcitol	64	0	0
Fructosa	65	65	100
Galactosa	65	23	35,3
Glucógeno	64	0	0
Inositol	86	0	0
Lactosa	86	72	83,7
Maltosa	86	86	100
Manosa	86	86	100
Melecitosa	66	41	62,1
Melobiosa	65	3	4,6
Rafinosa	86	3	3,4
Ramnosa	91	72	79,1
Sacarosa	65	57	87,6
Salicina	86	86	100
Trehalosa	86	86	100
Xilosa	64	41	64

Tabla 5-7

Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas de L.monocytogenes

195

	<u>Nº Cepas</u>	<u>Positivas</u>	<u>%</u>
Voges Proskauer	82	82	100
Rojo de metilo	82	82	100
Reducción de nitratos	82	0	0
Indol	82	0	0
Glucosa	82	82	100
Manitol	82	82	100
Esculina	82	82	100
Adonitol	35	0	0
Almidon	35	33	94,2
Amigdalina	35	35	100
Arabinosa	35	4	11,4
Celobiosa	35	35	100
Dextrina	35	34	97,1
Dulcitol	35	1	2,8
Fructosa	35	35	100
Galactosa	35	28	80
Glucógeno	26	0	0
Inositol	35	0	0
Lactosa	63	60	95,2
Maltosa	35	35	100
Manosa	35	35	100
Melecitosa	35	1	2,8
Melobiosa	NP	-	-
Rafinosa	35	0	0
Ramnosa	35	2	5,7
Sacarosa	35	4	11,4
Salicina	26	26	100
Trehalosa	35	35	100
Xilosa	35	13	37,1

Tabla B-8

Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas de L. grayi

	<u>Nº Cepas</u>	<u>Positivas</u>	<u>%</u>
Voges Proskauer	8	0	0
Rojo de metilo	8	8	100
Reducción de nitratos	8	8	100
Indol	8	0	0
Glucosa	8	8	100
Manitol	8	0	0
Esculina	8	8	100
Adonitol	8	0	0
Almidon	8	4	50
Amigdalina	8	8	100
Arabinosa	8	6	75
Celobiosa	8	8	100
Dextrina	8	6	75
Dulcitol	8	0	0
Fructosa	8	8	100
Galactosa	8	8	100
Glucógeno	8	6	75
Inositol	8	0	0
Lactosa	8	8	100
Maltosa	8	8	100
Manosa	8	8	100
Melecitosa	8	2	25
Melobiosa	8	2	25
Rafinosa	8	2	25
Sacarosa	8	6	75
Salicina	8	8	100
Trehalosa	8	8	100
Xilosa	8	6	75

Tabla B-9

Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas de L. denitrificans

	<u>Nº Cepas</u>	<u>Positivas</u>	<u>%</u>
Voges Proskauer	12	12	100
Rojo de metilo	12	12	100
Reducción de nitratos	12	12	100
Indol	12	0	0
Glucosa	12	12	100
Manitol	12	12	100
Esculina	12	12	100
Adonitol	12	0	0
Almidon	12	12	100
Amigdalina	12	12	100
Arabinosa	12	5	41,6
Celobiosa	12	12	100
Dextrina	12	12	100
Dulcitol	12	1	8,3
Fructosa	12	12	100
Galactosa	12	7	58,3
Glucógeno	12	0	0
Inositol	12	2	16,6
Lactosa	12	12	100
Maltosa	12	12	100
Manosa	12	12	100
Melecitosa	12	4	33,3
Rafinosa	12	0	0
Sacarosa	12	0	0
Salicina	12	12	100
Trehalosa	12	11	91,6
Xilosa	12	8	66,6

Tabla B-10

Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas de L.murrayi

nitol, con un 100% de resultados negativos.

Debemos también señalar que dos cepas de L. monocytogenes se comportaron de una forma atípica en la prueba del rojo de metilo, ya que en lugar del color rojo característico de la prueba, observamos una tonalidad final anaranjada; como todas las demás pruebas encajaban con las del género y especie, optamos por considerarlas positivas.

% DE RESULTADOS POSITIVOS

100  
90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10

199

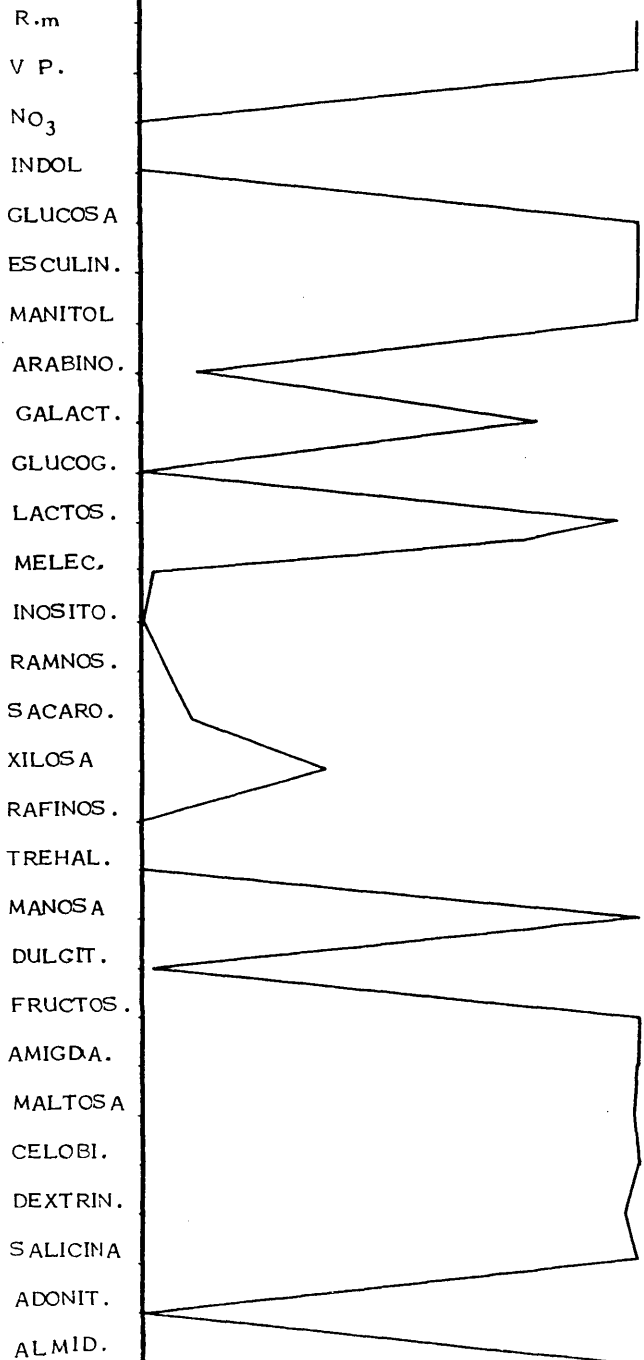


FIGURA B1: POLIGONO DE FRECUENCIAS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS DE L.gravi

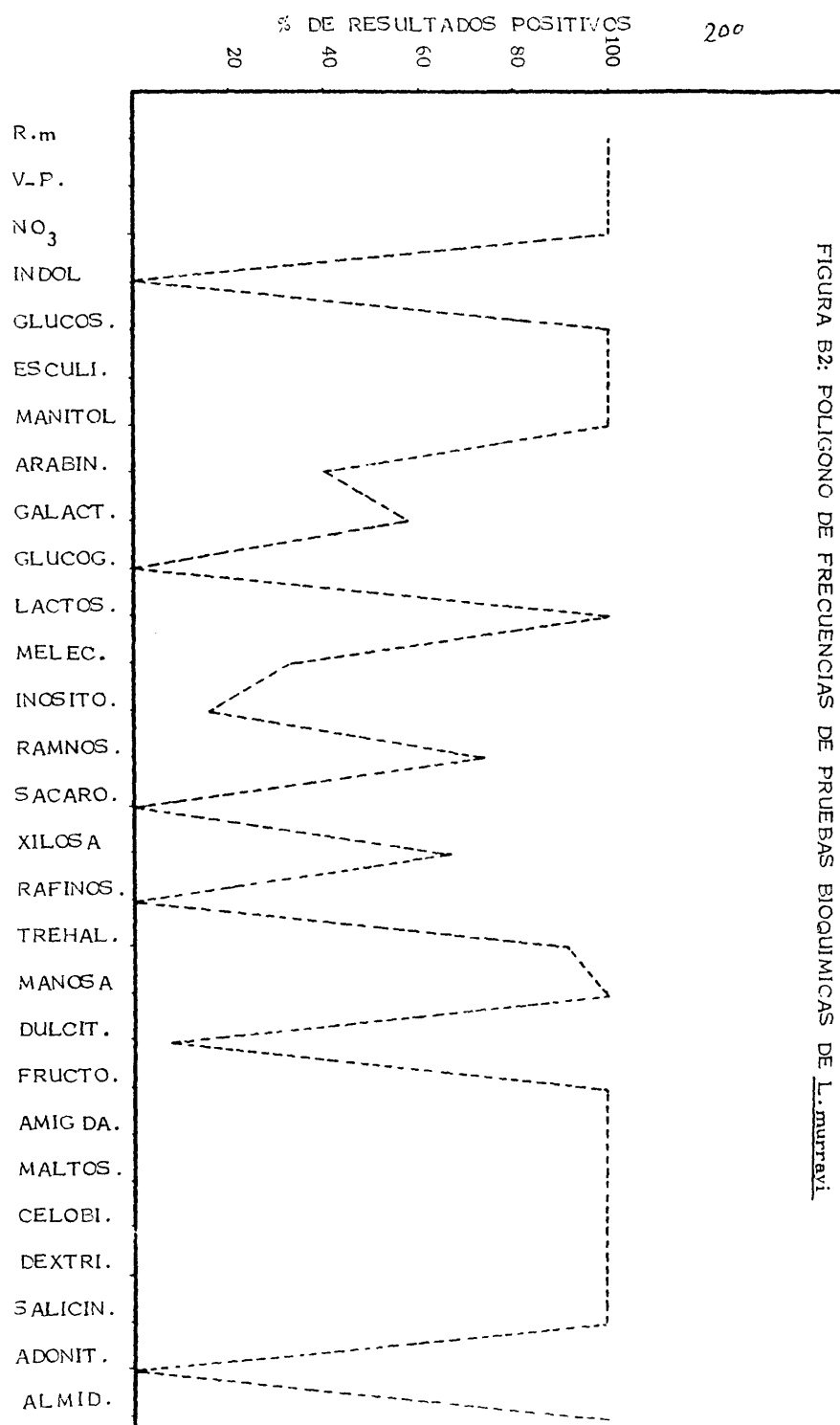


FIGURA B2: POLIGONO DE FRECUENCIAS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS DE L.muravi.

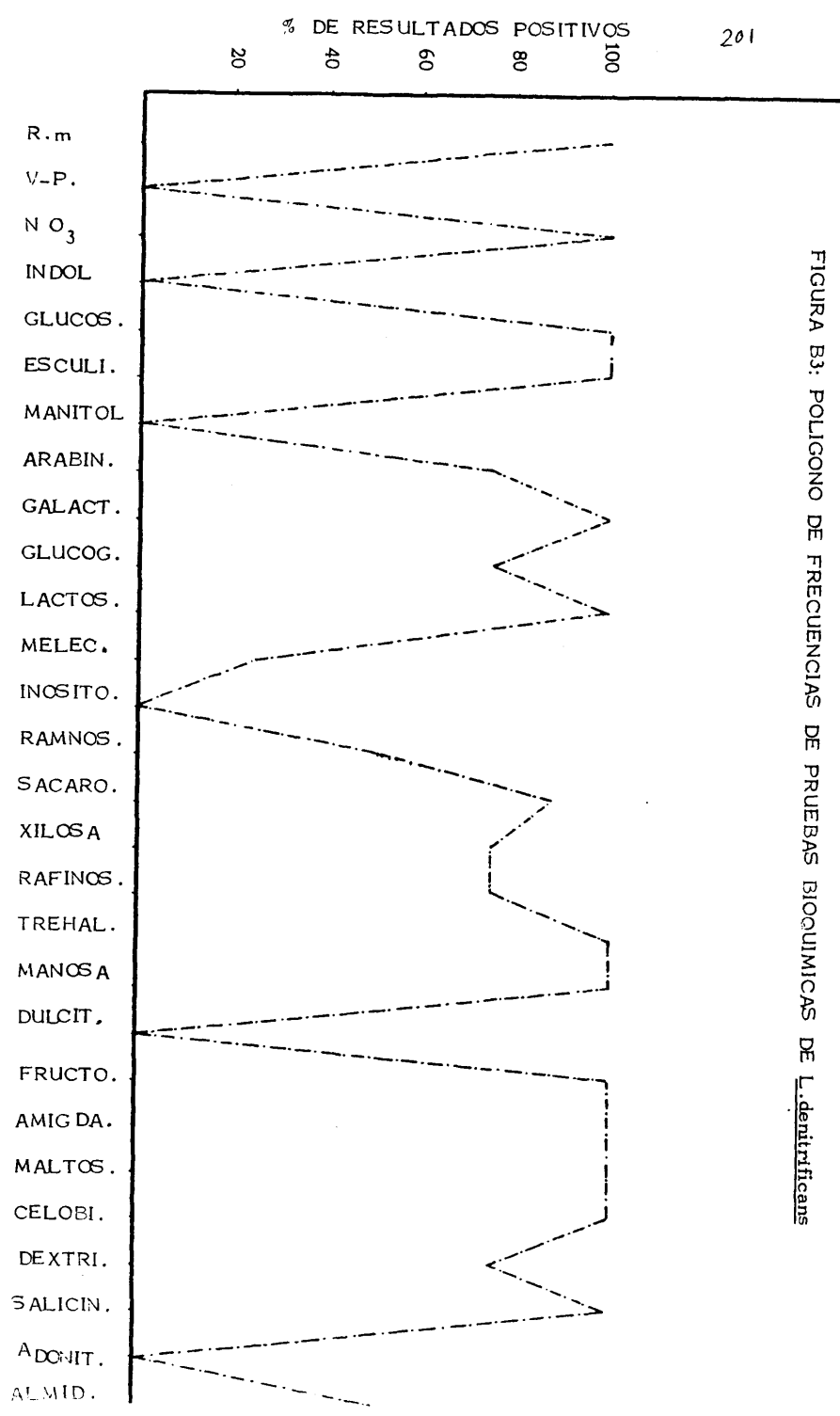


FIGURA B3: POLIGONO DE FRECUENCIAS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS DE L.dentrificans



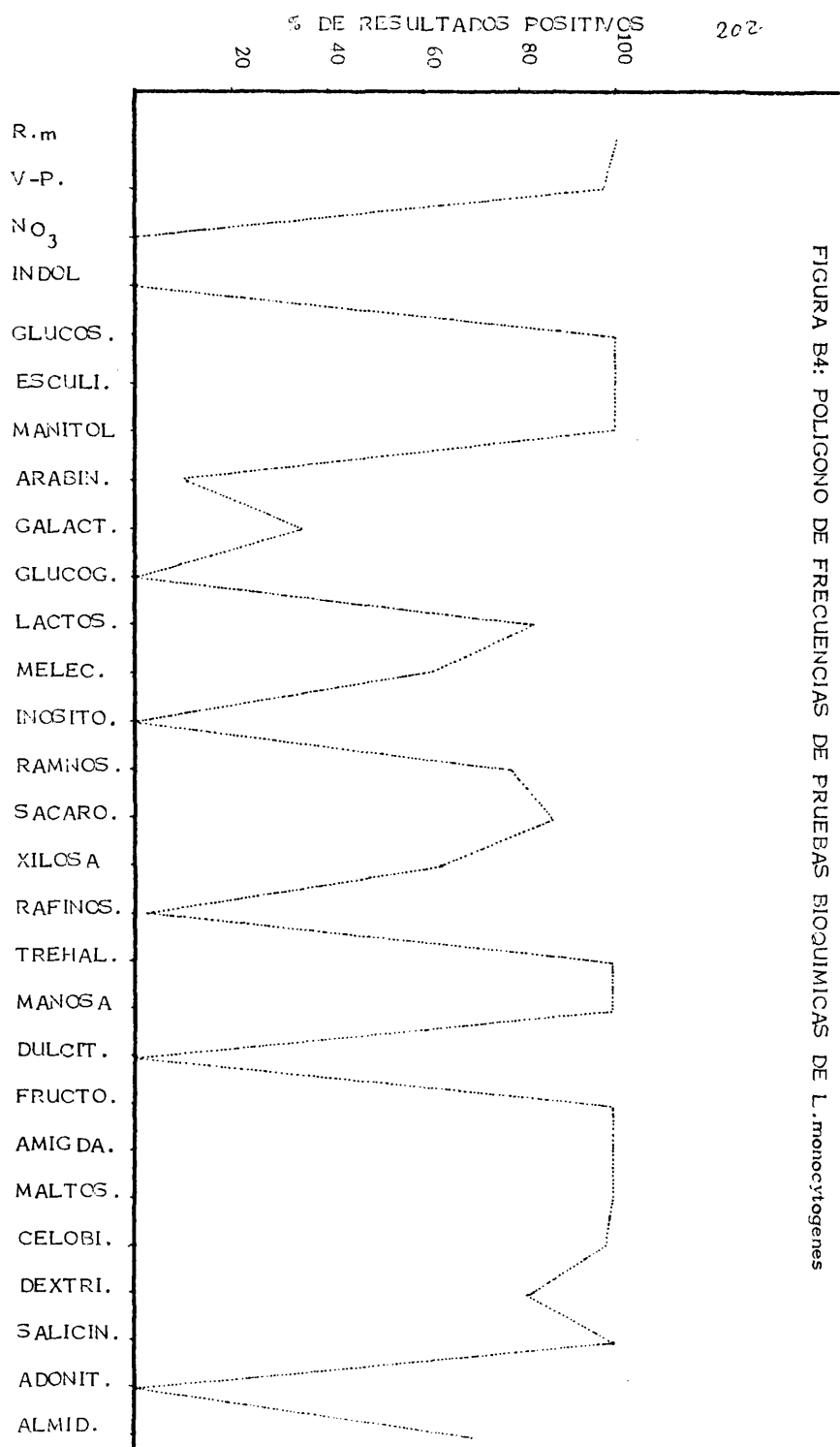


FIGURA B4: POLIGONO DE FRECUENCIAS DE PRUEBAS BIOQUIMICAS DE *L. monocytogenes*

#### V.5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA

Los resultados de las micropruebas para la comprobación de la actividad hemolítica de las distintas estirpes de -- origen fecal aisladas por nosotros fueron los siguientes:

Se realizaron pruebas sobre un total de 30 cepas de -- L. monocytogenes de origen bovino y 70 de L. monocytogenes, 60 de L. grayi, 12 de L. murrayi y 4 de L. denitrificans de origen ovino.

Todas las cepas de todas las especies mostraron capacidad hemolítica frente a los hematíes de carnero tras 24 horas -- de incubación (18 horas a 22°C y 6 horas a 4°C), cuando las suspensiones de las cepas se realizaron en glucosa al 0,5% en agua destilada, siendo los testigos totalmente negativos.

Cuando las suspensiones se practicaron en solución salina al 0,8%, tras las 24 horas de incubación y la comparación/ con los testigos, obtuvimos los resultados expresados en la tabla H-1.

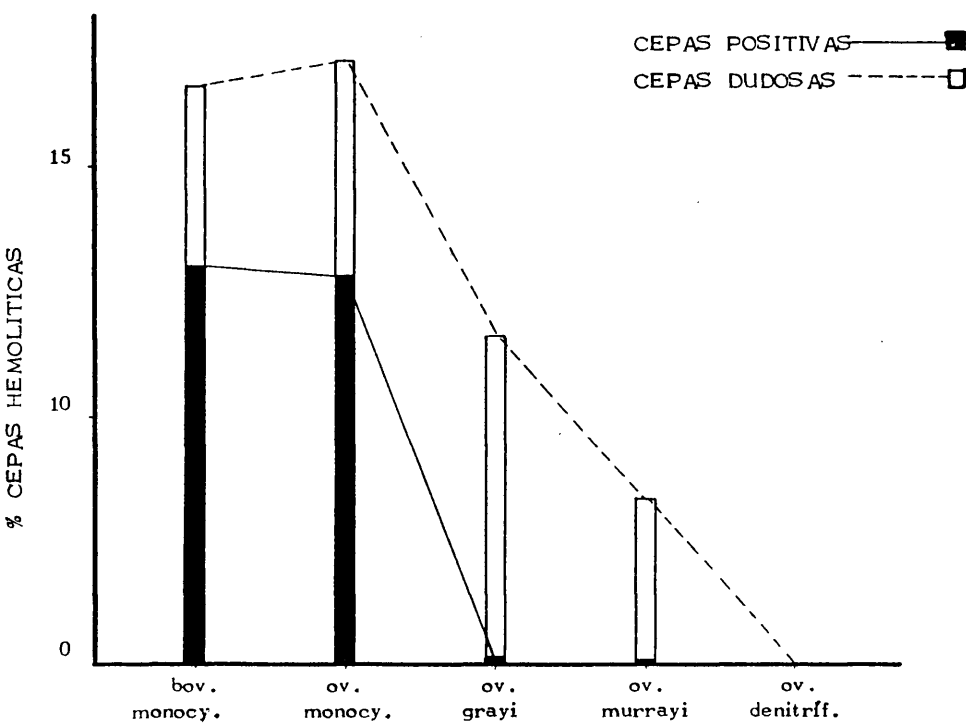
Como podemos observar en la figura H-1, los porcentajes de L. monocytogenes hemolíticos en el ganado ovino y bovino son muy parecidos, representando un 12,85 y un 13% respectivamente, siendo así mismo muy parecidos los porcentajes de las -- cepas que consideramos como dudosas, 17,14% y 16,6%.

Los porcentajes de respuesta de las otras especies del género, muestran también una gran uniformidad, no habiéndose en -- contrado ninguna cepa hemolítica y oscilando los casos de hemólisis dudosa entre el 0 y el 12%.

ESPECIE Y ORIGEN	CEPAS PROBADAS	CEPAS POSITIVAS	CEPAS DUDOSAS	CEPAS NEGATIVAS	% CEPAS POSITIVAS	% CEPAS DUDOSAS
L.monocytogenes BOVINO	30	4	5	21	13,00	16,6
L.monocytogenes OVINO	70	9	12	45	12,85	17,14
L.grayi OVINO	60	0	7	53	0,00	11,66
L.murrayi OVINO	12	0	1	11	0,00	8,33
L.denitrificans OVINO	4	0	0	4	0,00	0,00

TABLA H-1: PRESENCIA DE HEMOLISINAS EN LAS DISTINTAS CEPAS AISLADAS.

205



FIGURAH-1: % DE CEPAS CON HEMOLISIS POSITIVA O DUDOSA.

V.6. SEROLOGIA

Los títulos de anticuerpos valorados mediante aglutinación/ lenta en tubo, en los sueros recogidos de 110 vacas y 121 ovejas, -- así como la raza y edad de las mismas quedan recogidos en las si-- - guientes tablas (S-1 a S-10).

Nº de Referencia	RAZA	EDAD	TITULO
1	Hereford	Más de 3 años	1/80
2	"	"	1/160
3	Charolais	"	1/80
4	"	"	1/160
5	"	"	1/80
6	"	"	1/160
7	"	"	1/80
8	"	"	1/2560
9	"	"	1/2560
10	"	"	1/2560
11	"	"	1/2560

Tabla S-1: Ganado vacuno lote A

Nº de Referencia	RAZA	EDAD	TITULO
11	Cruces Avileña-Retinta	Menores de 18 meses	1/160
12	"	"	1/160
13	"	"	1/640
14	"	"	1/160
15	"	"	1/320
16	"	"	1/160
17	"	"	1/160
18	"	"	1/180
19	"	"	1/320
20	"	"	1/640
21	"	"	1/320
22	"	"	1/160
23	"	"	1/320
24	"	"	1/160
25	"	"	1/320
26	"	"	1/320
27	"	"	1/180
28	"	"	1/640
29	"	"	1/160
30	"	"	1/80
31	"	"	1/320

Tabla S-2: ganado vacuno lote B

203

Nº de referencia	RAZA	EDAD	TITULO
32	Cruces Avileña-Retinta-Frisón	2-3 años	1/640
33	"	"	1/160
34	"	"	1/640
35	"	"	1/640
36	"	"	1/640
37	"	"	1/280
38	"	"	1/320
39	"	"	1/160
40	"	"	1/320
41	"	"	1/160
42	"	"	1/320
43	"	"	1/640
44	"	"	1/640
45	"	"	1/640
46	"	"	1/160
47	"	"	1/160
48	"	"	1/320
49	"	"	1/160
50	"	"	1/320
51	"	"	1/320
52	"	"	1/320
53	"	"	1/160
54	"	"	1/320

Tabla S-3: ganado vacuno lote C

Nº de Referencia	RAZA Cruces	EDAD	TITULO
56	Frisona-Limousine	18 meses-3 años	1/320
57	"	"	1/320
58	"	"	1/160
59	"	"	1/320
60	"	"	1/160
61	"	Menos de 18 meses	1/40
62	"	"	1/80
63	"	"	1/40
64	"	"	1/20
65	"	"	1/160
66	"	"	1/160
67	"	"	1/160
68	"	"	1/180
69	"	"	1/160
70	"	Más de 3 años	1/1280
71	"	"	1/2560
72	"	"	1/1280
73	"	"	1/320
74	"	"	1/1280
75	"	"	1/40
76	"	"	1/1280
77	"	"	1/320
78	"	"	1/2560
79	"	"	1/1280

Tabla S-4: Ganado vacuno lote D



Nº de Referencia	RAZA	EDAD	TITULO
80	Cruces Charolais-Parda- Retinta-Avileña	18 meses y menores	1/160
81	"	"	1/40
81	"	"	1/40
83	"	"	1/80
84	"	"	1/40
85	"	"	1/40
86	"	"	1/80
87	"	"	1/160
88	"	"	1/320
89	"	"	1/320
90	"	"	1/160
91	"	"	1/20
92	"	"	1/80
93	"	"	1/40
94	"	"	1/20
95	"	"	1/40
96	"	"	1/160
97	"	"	1/160
98	"	"	1/160
99	"	"	1/320
100	"	"	1/320
101	"	"	1/160
102	"	"	1/320
103	"	"	1/160
104	"	"	1/320
105	"	"	1/160
106	"	"	1/320
107	"	"	1/320
108	"	"	1/320
109	"	"	1/640
110	"	"	1/40

Tabla S-5: ganado vacuno. Lote E

Nº de Referencia	RAZA	EDAD	TITULO
1	Entrefina	Pascual	1/20
2	"	"	1/20
3	"	"	1/20
4	"	"	1/320
5	"	"	1/80
6	"	"	1/20
7	"	"	no aglutinó
8	"	"	1/40
9	"	"	1/80
10	"	"	1/80
11	"	"	no aglutinó
12	"	"	1/20
13	"	"	1/20
14	"	"	1/20
15	"	"	1/60
16	"	"	no aglutinó
17	"	"	"
18	"	"	"
19	"	"	1/40
20	"	"	1/40
21	"	"	no aglutinó
22	"	"	1/20
23	"	"	1/20
24	"	"	1/20
25	"	"	no aglutinó
26	"	"	"
27	"	"	1/160
28	"	"	1/40

Tabla S-6: ganado ovino. Lote A

212

Nº de Referencia	RAZA	EDAD	TITULO
29	Entrefina	Pascual	1/20
30	"	"	1/160
31	"	"	1/80
32	"	"	1/20
33	"	"	1/40
34	"	"	1/20
35	"	"	1/40
36	"	"	no aglutinó
37	"	"	1/20
38	"	"	1/160
39	"	"	1/20
40	"	"	1/40
41	"	"	1/20
42	"	"	1/20
43	"	"	1/80
44	"	"	1/160
45	"	"	no aglutinó
46	"	"	no aglutinó
47	"	"	1/80
48	"	"	1/160
49	"	"	1/20
50	"	"	no aglutinó
51	"	"	1/20
52	"	"	no aglutinó
53	"	"	1/20
54	"	"	no aglutinó
55	"	"	1/20
56	"	"	no aglutinó
57	"	"	no aglutinó
58	"	"	1/20
59	"	"	1/80
60	"	"	1/160
61	"	"	1/20

Tabla S6 (Continuación): Ganado ovino lote A

Nº de Referencia	RAZA	EDAD	TITULO
62	Entrefina	Lechal	1/20
63	"	"	no aglutinó
64	"	"	"
65	"	"	"
66	"	"	"
67	"	"	"

Tabla S-7: Ganado ovino lote B

Nº de Referencia	RAZA	EDAD	TITULO
68	Entrefina	Mas del año	1/320
69	"	"	1/160
70	"	"	1/180
71	"	"	1/140
72	"	"	1/320
73	"	"	1/20
74	"	"	1/160
75	"	"	1/320
76	"	"	1/160
77	"	"	1/320
78	"	"	1/2560
79	"	"	1/320
80	"	"	1/40
81	"	"	1/320

Tabla S-8: ganado ovino lote C

21h

Nº de Referencia	RAZA	EDAD	TITULO
82	Churra	Mas del año	1/80
83	"	"	1/160
84	"	"	1/1280
85	"	"	1/160
86	"	"	1/140
87	"	"	1/140
88	"	"	1/320
89	"	"	1/320
90	"	"	1/40
91	"	"	1/20
92	"	"	1/80
93	"	"	1/40
94	"	"	1/20
95	"	"	1/40
96	"	"	1/80
97	"	"	1/40
98	"	"	1/160
99	"	"	1/40

Tabla S-9: Ganado ovino lote D

215

Nº de Referencia	RAZA	EDAD	TITULO
100	Merina	Mas de 1 año	1/320
101	"	"	1/160
102	"	"	1/80
103	"	"	1/160
104	"	"	1/80
105	"	"	1/160
106	"	"	1/160
107	"	"	1/160
108	"	"	1/640
109	"	"	1/320
110	"	"	1/160
111	"	"	1/80
112	"	"	1/320
113	"	"	1/160
114	"	"	1/160
115	"	"	1/80
116	"	"	1/320
117	"	"	1/640
118	"	"	1/80
119	"	"	1/160
120	"	"	1/160
121	"	"	1/160
122	"	"	1/180
123	"	"	1/160
124	"	"	1/320

Tabla S-10:Ganado ovino lote E

Las frecuencias absolutas con que aparecen cada uno de los títulos, quedan reflejados en las tablas S-11 y S-12, - quedando los polígonos de frecuencias en la figura S-1.

TITULO	FRECUENCIA
No aglutinación	0
1/20	3
1/40	10
1/80	11
1/160	34
1/320	28
1/640	11
1/1280	6
1/2560	7

TABLA S11: FRECUENCIAS ABSOLUTAS GANADO BOVINO

TITULO	FRECUENCIA
No aglutinación	21
1/20	27
1/40	17
1/80	17
1/160	25
1/320	13
1/640	2
1/1280	1
1/2560	1

TABLA S12: FRECUENCIAS ABSOLUTAS GANADO OVINO.

EDAD \ TITULO	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	TOTAL
AÑOJOS	3	9	8	22	15	4	-	-	61
ERALES	-	-	-	10	11	7	1	-	29
VACUNO MAYOR	-	1	3	2	2	-	5	7	20
TOTAL	3	10	11	34	28	11	6	7	110

TABLA S13: CORRELACION DE TITULOS Y EDADES GANADO BOVINO.

211

EDAD \ TITULO	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	TOTAL
AÑOJOS	4,9	14,7	13,1	36,0	24,5	6,5	-	-	100
ERALES	-	-	-	34,4	37,9	24,1	3,4	-	100
VACUNO MAYOR	-	5,0	15,0	10,0	10,0	-	25,0	35,0	100

TABLA S14: CORRELACION DE PORCENTAJE GANADO BOVINO.



EDAD \ TITULO	0	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	TOTAL
LECHAL	5	1	-	-	-	-	-	-	-	6
PASCUAL	16	23	8	6	7	1	-	-	-	61
OVINO MAYOR	-	3	9	11	18	12	2	1	1	51
TOTAL	21	27	17	17	25	13	2	1	1	124

TABLA S15: CORRELACION TITULOS Y EDADES GANADO OVINO.

218

EDAD \ TITULO	0	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	TOTAL
LECHAL	83,3	16,6	-	-	-	-	-	-	-	100
PASCUAL	26,2	37,7	13,1	9,8	11,4	1,6	-	-	-	100
OVINO MAYOR	-	5,3	15,8	19,3	31,6	21,1	3,5	1,7	1,7	100

TABLA S16: PORCENTAJE DE FRECUENCIAS TITULOS Y EDADES GANADO OVINO.

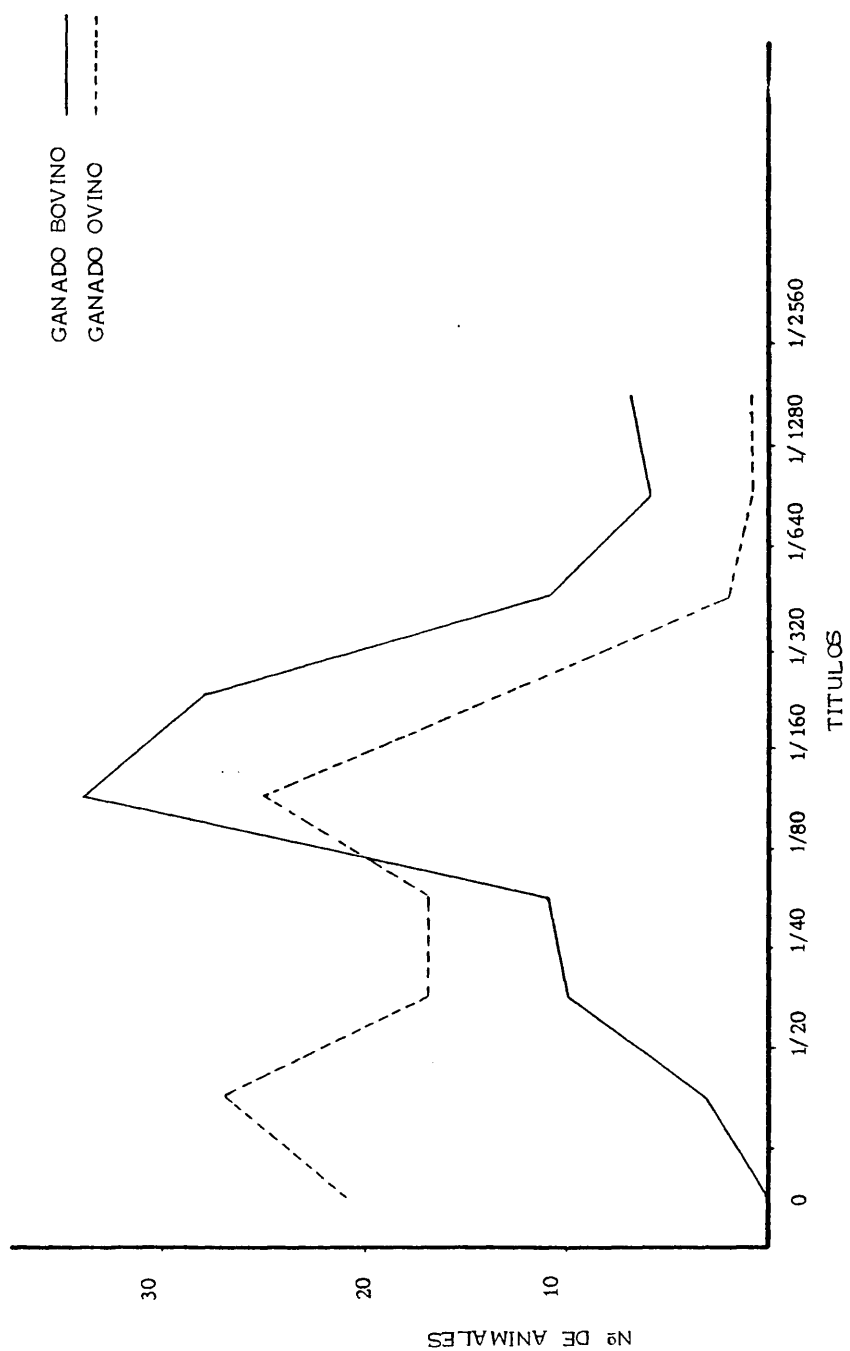


FIGURA S1: FRECUENCIAS ABSOLUTAS GANADO BOVINO Y OVINO.

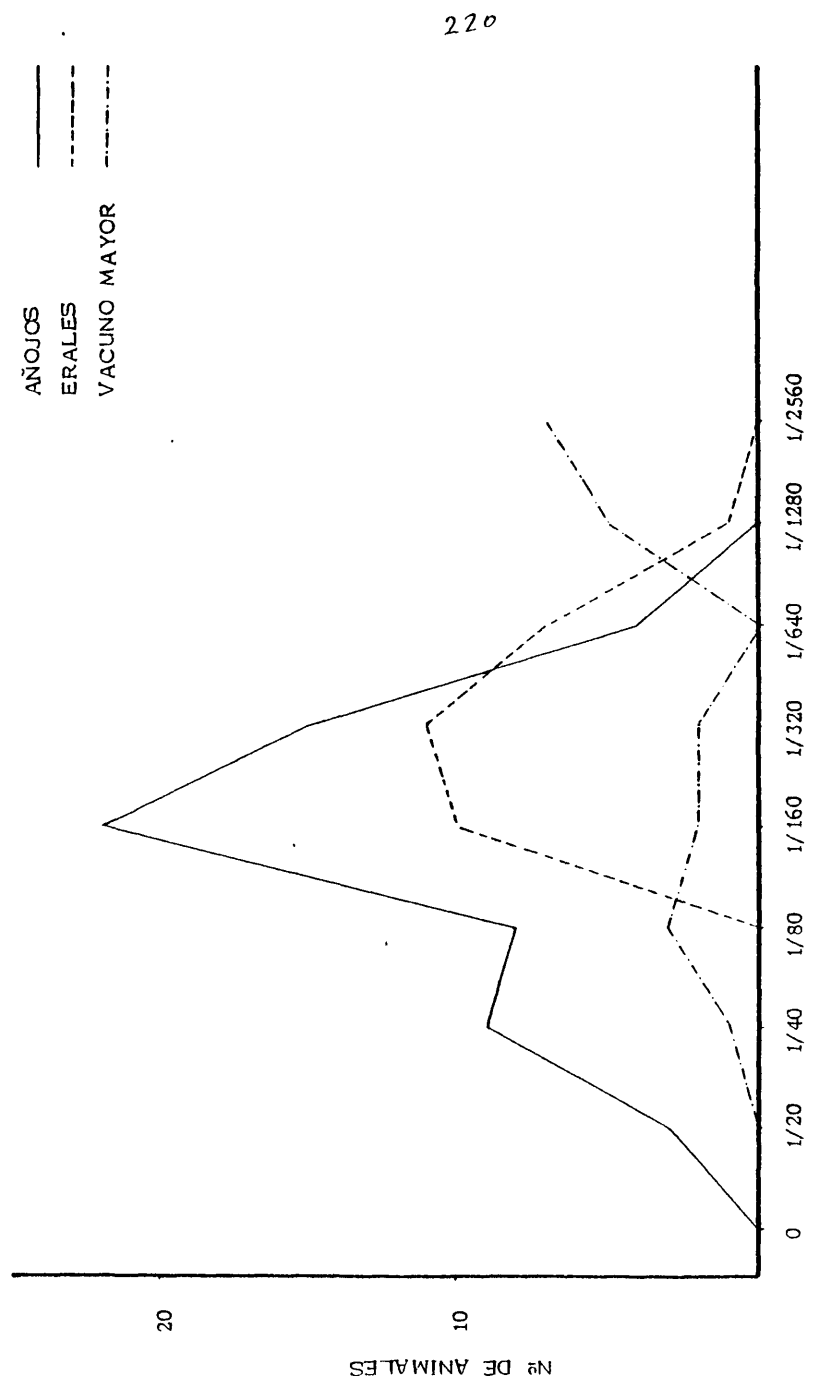


FIGURA S2: GANADO BOVINO FRECUENCIAS ABSOLUTAS

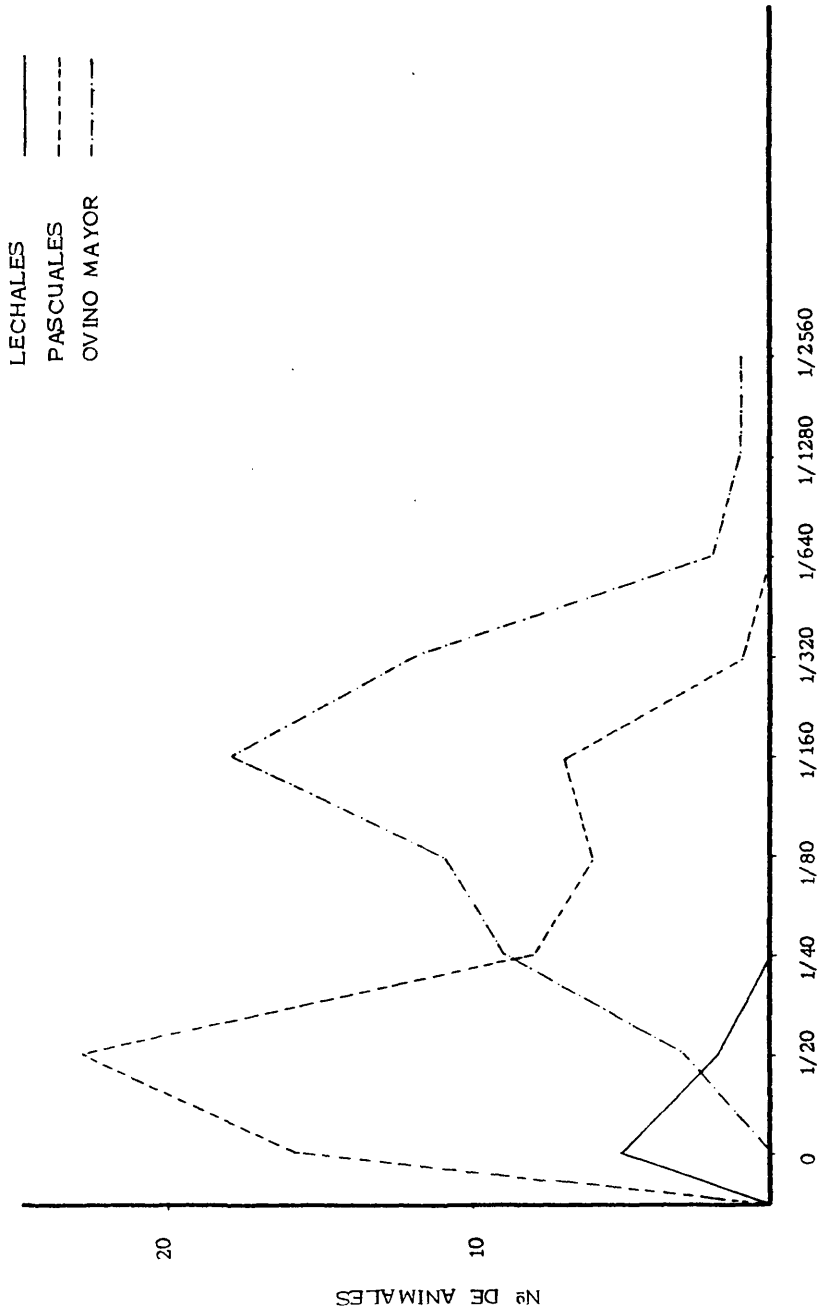


FIGURA S3: GANADO OVINO FRECUENCIAS ABSOLUTAS

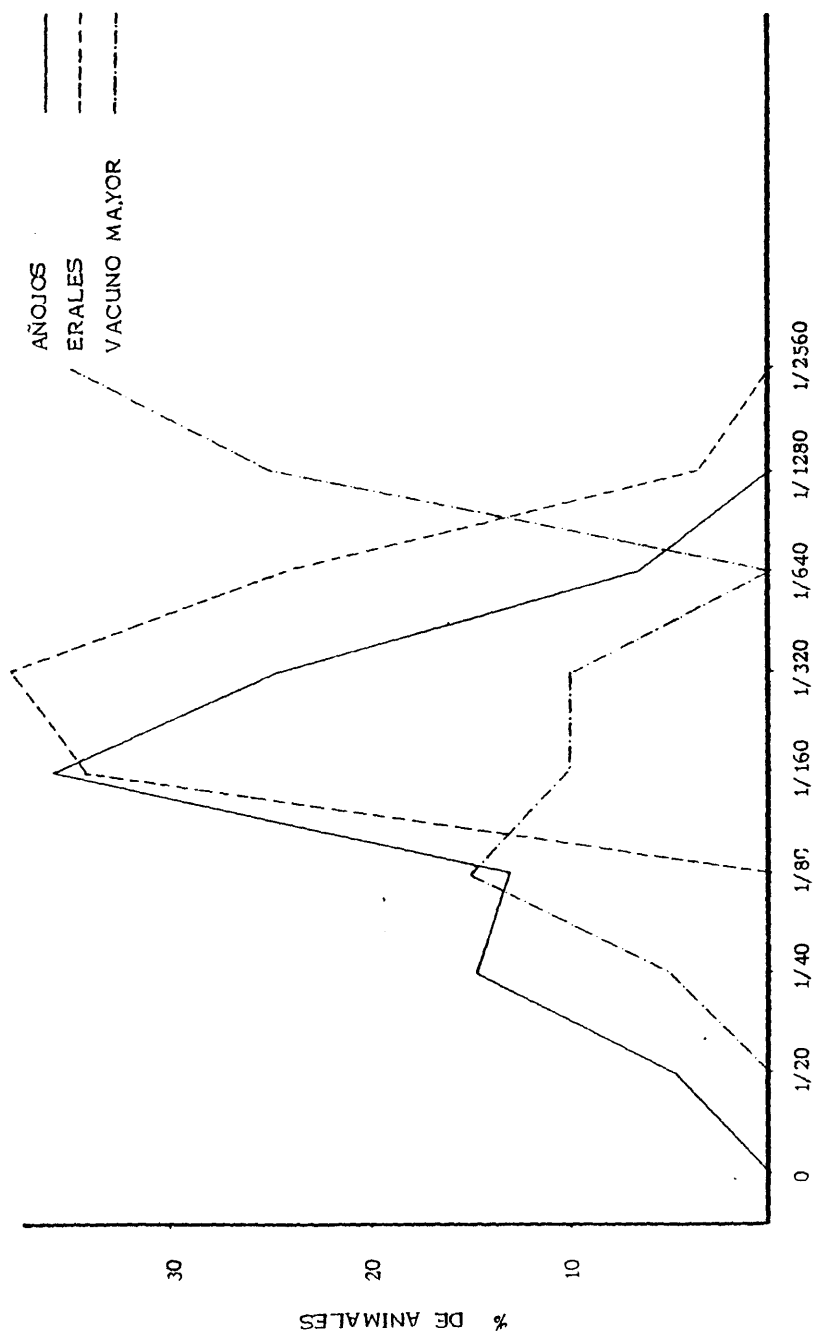


FIGURA S4: CANADO BOVINO PORCENTAJE DE FRECUENCIAS

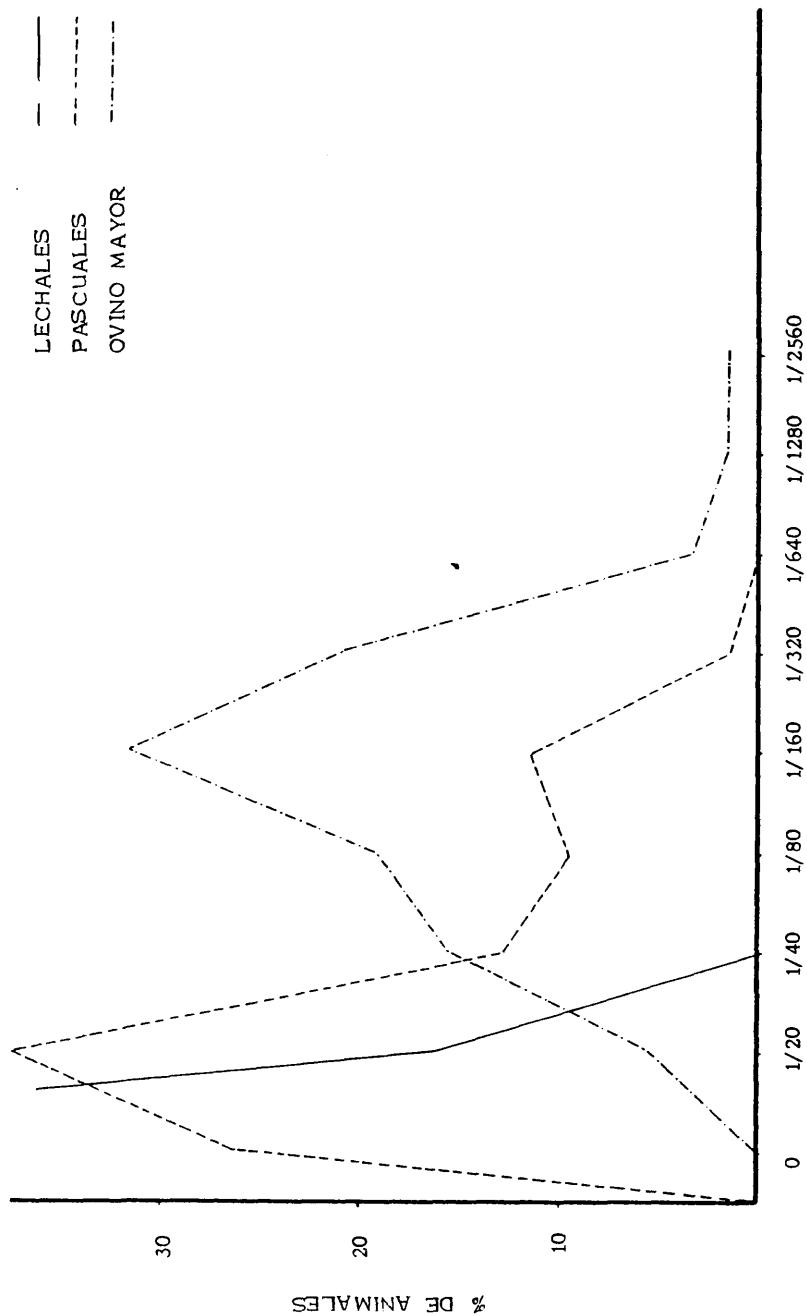


FIGURA S5: GANADO OVINO PORCENTAJE DE FRECUENCIAS

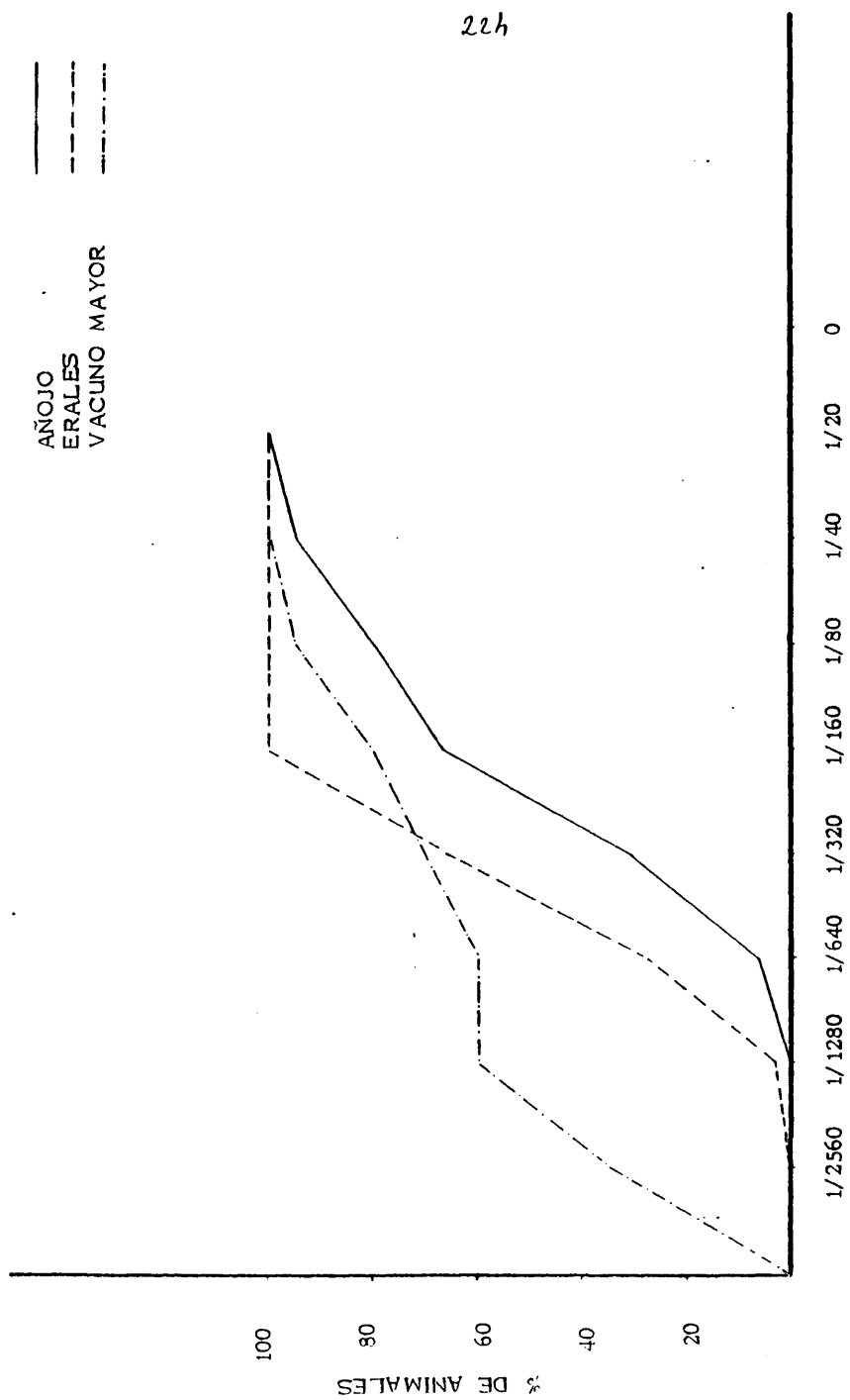


FIGURA S6: GANADO BOVINO PORCENTAJE DE FRECUENCIAS ACUMULADA

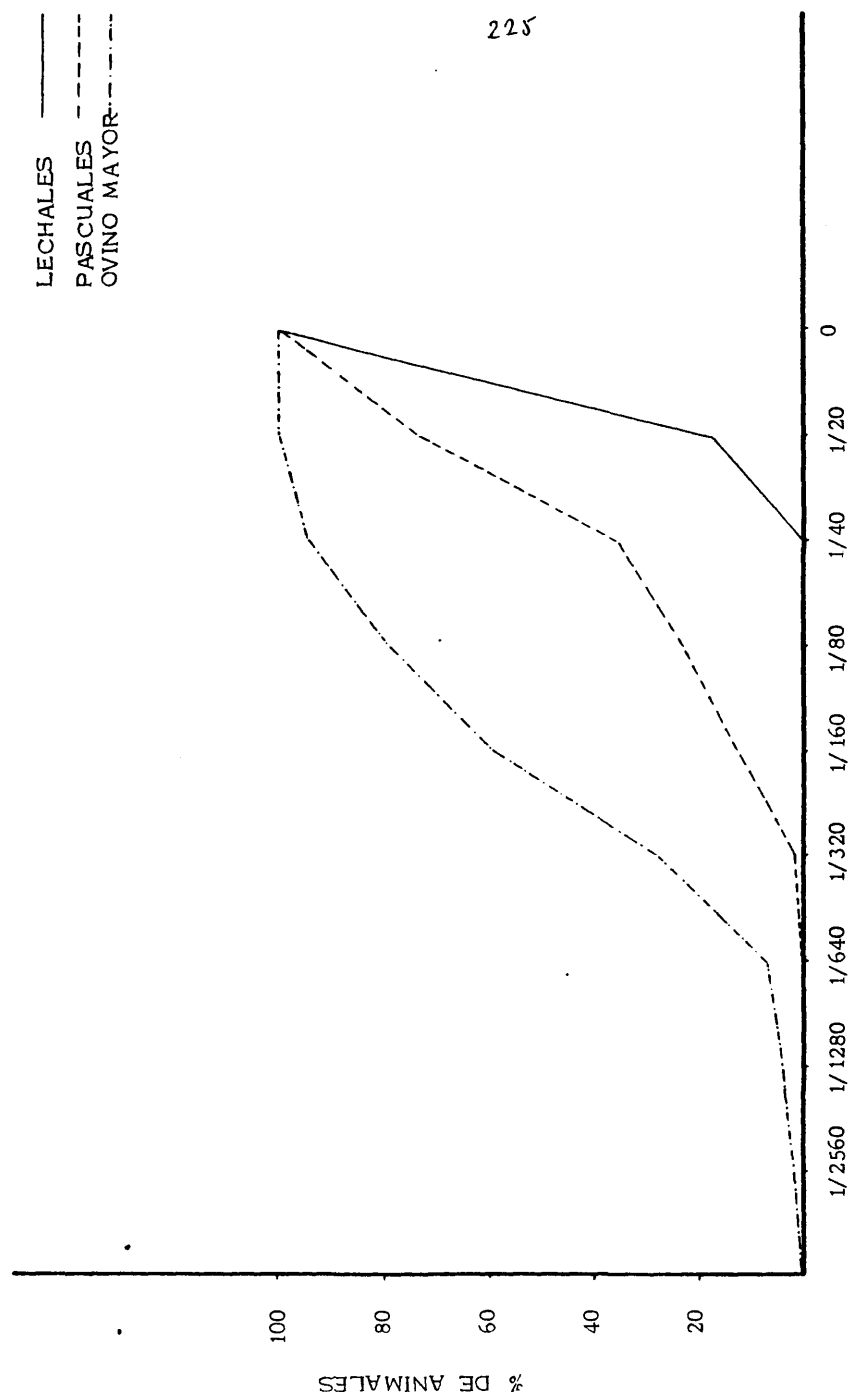


FIGURA S7: GANADO OVINO PORCENTAJE DE FRECUENCIAS ACUMULADA



Dado que hemos establecido, tanto para el ganado ovino como para el bovino, diferencias en los distintos lotes, sobre todo en lo que hace referencia a la edad, intentaremos establecer, por si existiera, una correlación entre edad y título serológico.

Para ello hemos clasificado a los diversos animales en 3 grupos: añejos, erales y vacuno mayor, para el ganado vacuno, que se corresponden con edades límites de 18, 24 y 36 meses respectivamente; y lechales, pascuales y ovino mayor, para el ganado ovino, que se corresponden con edades límites de 3, 6 y 12 meses. Hay que tener en cuenta que esta división no se corresponde exactamente con la que se realiza comercialmente en los mataderos, sin embargo, son unos límites de clase que se ajustan perfectamente a la media de animales que se sacrifican actualmente en los mataderos. Quedando reflejada en las tablas S-13, S-14, S-15 y S-16, la correlación existente entre títulos y edades.

Nos encontramos pues en el ganado ovino con una media para los títulos  $\bar{X} = 0,0342$  y una media para las edades de 8,612 meses (presuponiendo que todo el ganado ovino mayor tenía 1 año). Hemos establecido como medias provisionales de trabajo las de  $A = 0,0125$  para los títulos y  $B = 6$  para las edades, siendo por tanto las varianzas  $\sigma_x^2 = 1,5 \cdot 10^{-3}$  para títulos séricos y  $\sigma_y^2 = 10,17$  para las edades; luego la covarianza será  $p = -0,063$  y el coeficiente de correlación  $r = -0,3$ .

Luego, indiscutiblemente, existe una correlación negativa entre los títulos séricos encontrados y las edades para el ganado ovino; repitiendo la misma operación para el ganado bovino, presuponiendo que todo el ganado vacuno mayor tenía 3 años, nos encontramos con una media  $\bar{X} = 0,048$  para los títulos séricos y  $\bar{Y} = 23,5$  para las edades, para unas medias provisionales de  $A = 0,0125$  y  $B = 18$ .

Por tanto, las varianzas serán  $\sigma^2_x = 1,23.10^{-3}$  y  $\sigma^2_y = 28,31$  y la covarianza  $p = -0,015$ , siendo el coeficiente de correlación  $r = -0,833$ ; luego existe una correlación negativa muy fuerte entre los títulos séricos encontrados y las edades de los animales muestreados, ya que el coeficiente se aproxima mucho a  $-1$ .

Si comparamos las 2 poblaciones (ovina y bovina) mediante sus medias, nos encontramos con un error "standard" entre las 2 poblaciones  $Sd = 4,80.10^{-3}$ ; y por lo tanto, la relación entre la diferencia de sus medias y su error "standard" es  $t = 4,04$ , valor que es superior al límite correspondiente para un grado de seguridad del 95% que es 2. Por tanto, es una probabilidad extremadamente débil que las diferencias observadas sean únicamente fortuitas y debe pues admitirse, que esta diferencia entre las dos poblaciones es altamente significativa, circunstancia que también puede verificarse por superposición, en las transparencias de las figuras de las frecuencias absolutas, porcentaje de frecuencias y frecuencias acumuladas S-2, S-3, S-4, S-5, S-6 y S-7.

#### V.7. ANTIBIOGRAMAS

En 93 de las estirpes de L. monocytogenes que conseguimos aislar en las distintas etapas de nuestro trabajo realizamos una vez tipificadas, un test de sensibilidad a diez de los antibióticos más utilizados en la práctica clínica por nuestros veterinarios.

Hallamos la sensibilidad de cada una de las cepas a los distintos antibióticos utilizados, mediante la aplicación de los halos de inhibición obtenidos a las rectas de regresión, previamente calculadas y expuestas en el capítulo de Material y Métodos.

Los resultados, desglosados por especies en las que se practicaron los aislamientos, vienen expresados en las siguientes tablas e histogramas de frecuencias (tablas AB-1, AB-2, - AB-3, AB-4, AB-5, AB-6 y figuras AB-1, AB-2 y AB-3).

Según su respuesta a los distintos antibióticos, hemos clasificado todas las cepas probadas en 3 categorías:

- Sensibles
- Intermedias
- Resistentes.

Considerando como sensibles aquellas en que su CMI era igual o menor a la concentración plasmática que se consigue para cada antibiótico tras el suministro de una dosis terapéutica normal; intermedias aquellas cepas en las que su CMI era menor o igual a la concentración plasmática que se consigue tras el suministro de una dosis de antibiótico no habitual pero no tóxica, o que por un fenómeno de bioconcentración en algún órgano de la economía animal pudiera servir para tratar una listeriosis localizada en ese órgano; y como resistentes hemos considerado las cepas que solamente son inhibidas por una concentración antibiótica que pudiera ser tóxica, caso de intentar alcan

TABLA AB-1: GANADO OVINO CEPAS SENSIBLES.

ANTIBIOTICOS	Cepas probadas	Cepas sensibles	%	H. máx	CMI. mín	H. mín	CMI. máx	H. m	CMI. m
PENICILINA	61	15	24'5	34	0'088	22	1'00	28'5	0'28
CEFALOTINA	61	18	29'5	25	1'31	18	9'18	21'6	3'48
ESTREPTOMICINA	61	45	73'7	24	1'74	20	5'27	22'6	2'46
GENTAMICINA	61	21	34'4	24	1'23	21	2'82	22'8	1'74
TETRACICLINA	61	8	13'1	25	0'53	19	2'63	23'6	0'75
ERITROMICINA	61	56	91'8	28	0'20	18	3'03	25'6	0'37
LINCOMICINA	61	2	3'2	24	0'80	22	1'41	23'0	1'07
RIFAMPICINA	61	61	100	24	0'87	19	4'00	22'4	2'82
CLORANFENICOL	61	8	13'1	23	8'00	18	21'11	20'3	13'92
KANAMICINA	61	29	47'5	24	1'31	18	6'96	22'1	2'29

H. máx: halo máximo en mm.

CMI. máx: concentración mínima inhibitoria máxima en mcg/ml.

H. mín: halo mínimo en mm.

CMI. mín: concentración mínima inhibitoria mínima en mcg/ml.

H.m: halo medio en mm.

CMI. m: concentración mínima inhibitoria media en mcg/ml.

TABLA AB-2: GANADO BOVINO CEPAS SENSIBLES.

ANTIBIOTICOS	Cepas probadas	Cepas sensibles	%	H. máx.	CMI. mín.	H. mín.	CMI. máx.	H. m.	CMI. m.
PENICILINA	32	13	40'6	35	0'076	22	1'00	28'3	0'28
CEFALOTINA	32	12	37'5	24	1'62	18	9'18	22'3	2'63
ESTREPTOMICINA	32	8	25'0	25	1'31	20	5'27	23'1	2'14
GENTAMICINA	32	14	43'7	24	1'23	21	2'82	22'6	1'86
TETRACICLINA	32	8	25'0	24	0'70	19	2'63	23'3	0'81
ERITROMICINA	32	26	81'2	26	0'35	18	3'03	23'4	0'70
LINCOMICINA	32	2	6'2	22	1'41	21	2'00	21'5	1'68
RIFAMPICINA	32	32	100	26	0'50	19	4'00	24'2	0'81
CLORANFENICOL	32	9	28'1	24	6'49	18	21'11	21'6	10'55
KANAMICINA	32	19	59'3	25	1'07	18	6'96	22'9	1'86

H. máx: halo máximo en mm.

CMI. máx: concentración mínima inhibitoria máxima en mcg/ml.

H. mín: halo mínimo en mm.

CMI. mín: concentración mínima inhibitoria mínima en mcg/ml.

H. m: halo medio en mm.

CMI. m: concentración mínima inhibitoria media en mcg/ml.

TABLA AB-3 : GANADO OVINO CEPAS INTERMEDIAS.

ANTIBIOTICOS	Cepas probadas	Cepas intermedias	%	H. máx	CMI. mín.	H. mín.	CMI. máx.	H. m.	CMI. m.
PENICILINA	61	46	75'4	21	1'41	12	8'00	18'8	2'00
CEFALOTINA	61	43	70'4	17	12'12	15	22'62	16'2	16'00
ESTREPTOMICINA	61	16	26'2	19	6'49	14	27'85	16'8	12'12
GENTAMICINA	61	40	65'5	20	3'73	16	10'55	18'0	6'06
TETRACICLINA	61	26	42'6	18	3'24	15	7'46	16'5	4'92
ERITROMICINA	61	5	8'1	17	4'00	14	8'57	15'9	5'65
LINCOMICINA	61	23	37'7	20	2'82	14	17'14	18'9	3'73
RIFAMPICINA	61	0	0	0	0	0	0	0	0
CLORANFENICOL	61	36	59	17	25'99	13	59'71	15'4	34'29
KANAMICINA	61	30	49'1	17	9'18	14	19'69	15'5	12'99

H.máx : halo máximo en mm.

CMI.máx:concentración mínima inhibitoria máxima en mcg/ml.

H.mín:halo mínimo en mm.

CMI.mín:concentración mínima inhibitoria mínima en mcg/ml.

H.m:halo medio en mm.

CMI.m:concentración mínima inhibitoria media en mcg/ml.

TABLA AB-4: GANADO BOVINO CEPAS INTERMEDIAS.

ANTIBIOTICOS	Cepas probadas	Cepas intermedias	%	H.máx	CMI.mín	H.mín	CMI.máx	H.m.	CMI.m.
PENICILINA	32	16	50'0	21	1'41	12	8'00	18'6	2'14
CEFALOTINA	32	20	62'5	17	12'12	15	22'62	15'9	17'14
ESTREPTOMICINA	32	23	71'8	19	6'49	14	27'85	17'3	10'55
GENTAMICINA	32	18	56'2	20	3'73	17	8'00	17'8	6'49
TETRACICLINA	32	15	46'8	18	3'24	15	7'46	16'8	4'84
ERITROMICINA	32	6	18'7	17	4'00	15	6'49	16'4	4'59
LINCOMICINA	32	21	65'6	20	2'82	14	17'14	16'8	7'46
RIFAMPICINA	32	0	0	0	0	0	0	0	0
CLOXANFENICOL	32	20	62'5	17	25'99	13	59'71	15'6	36'75
KANAMICINA	32	13	40'6	17	9'18	14	19'69	15'4	13'92

H.máx: halo máximo en mm.

H.mín: halo mínimo en mm.

H.m: halo medio en mm.

CMI.máx: concentración mínima inhibitoria máxima en mcg/ml

CMI.mín: concentración mínima inhibitoria mínima en mcg/ml.

CMI.m: concentración mínima inhibitoria media en mcg/ml.

TABLA AB-5 : GANADO OVINO CEPAS RESISTENTES.

ANTIBIOTICOS	Cepas probadas	Cepas resistentes	%	H.máx	CMI.mín	H.mín	CMI.máx	H.m	CMI.m
PENICILINA	61	0	0	0	0	0	0	0	0
CEFALOTINA	61	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTREPTOMICINA	61	0	0	0	0	0	0	0	0
GENTAMICINA	61	0	0	0	0	0	0	0	0
TETRACICLINA	61	27	44'2	14	9'18	7	59'7	11'6	18'37
ERITROMICINA	61	0	0	0	0	0	0	0	0
LINCOMICINA	61	36	59	13	24'25	7	157'58	10'8	48'5
RIFAMPICINA	61	0	0	0	0	0	0	0	0
CLORANFENICOL	61	17	27'8	12	73'51	8	168'89	10'4	103'96
KANAMICINA	61	2	3'2	13	25'99	11	45'25	12	34'29

H.máx: halo máximo en mm.

H.mín: halo mínimo en mm.

H.m: halo medio en mm.

CMI.máx: concentración mínima inhibitoria máxima en mcg/ml.

CMI.mín: concentración mínima inhibitoria mínima en mcg/ml

CMI.m: concentración mínima inhibitoria media en mcg/ml.



TABLA AB-6:GANADO BOVINO CEPAS RESISTENTES.

ANTIBIOTICOS	Cepas probadas	Cepas resistentes	%	H.máx	CMI.mín	H.mín	CMI.máx	H.m	CMI.m
PENICILINA	32	3	9'3	11	10'55	8	18'37	9'6	12'9
CEFALOTINA	32	0	0	0	0	0	0	0	0
ESTREPTOMICINA	32	1	3'1	12	48'5	12	48'5	12	48'5
GENTAMICINA	32	0	0	0	0	0	0	0	0
TETRACICLINA	32	9	28'1	14	9'18	8	45'25	12'4	14'92
ERITROMICINA	32	0	0	0	0	0	0	0	0
LINCOMICINA	32	9	28'1	13	24'25	8	11'43	11'3	39'39
RIFAMPICINA	32	0	0	0	0	0	0	0	0
CLORANFENICOL	32	3	9'3	12	73'51	9	137'18	10'6	97
KANAMICINA	32	0	0	0	0	0	0	0	0

H.máx: halo máximo en mm.

H.mín: halo mínimo en mm.

H.m: halo medio en mm.

CMI.máx: concentración mínima inhibitoria máxima en mcg/ml.

CMI.mín: concentración mínima inhibitoria mínima en mcg/ml

CMI.m: concentración mínima inhibitoria media en mcg/ml.

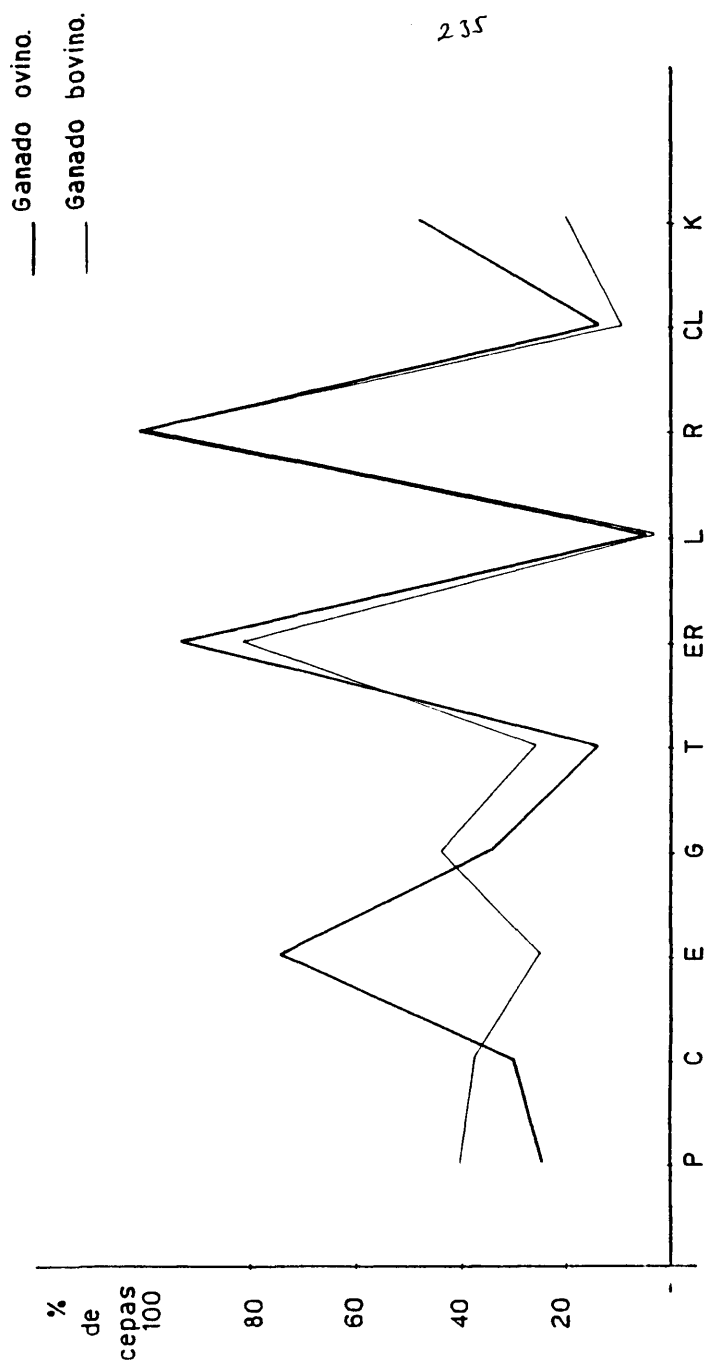


FIGURA AB-1: FRECUENCIAS DE CEPAS SENSIBLES DE GANADO OVINO Y BOVINO.

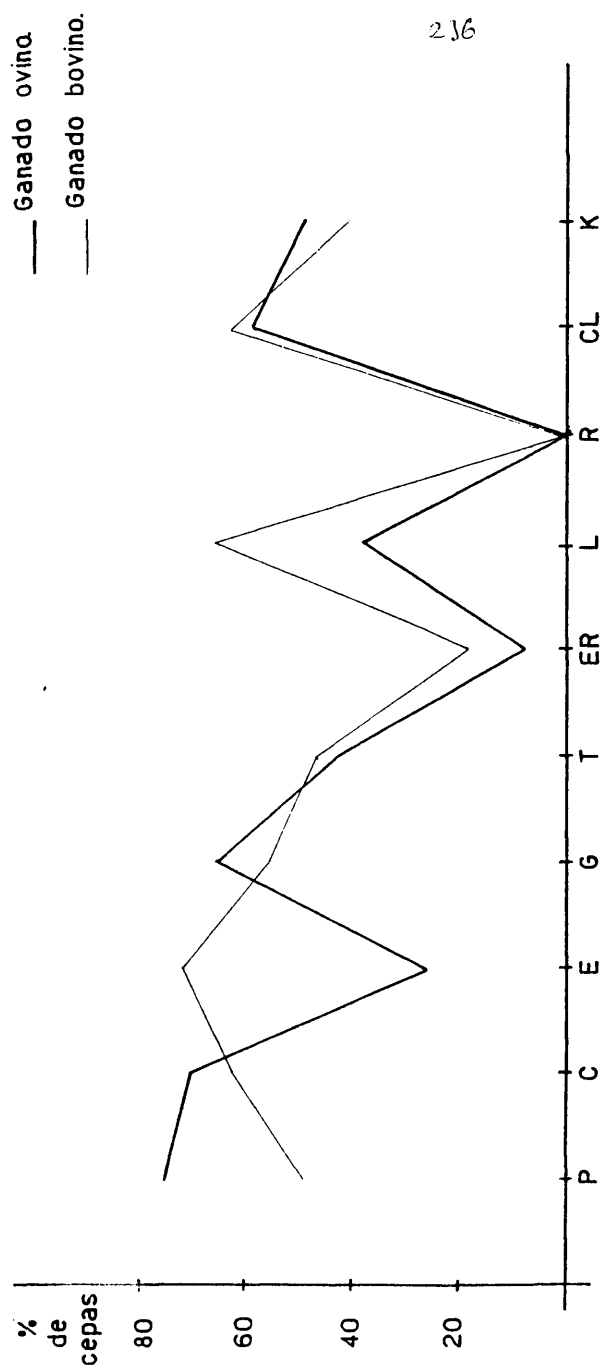


FIGURA AB-2: FRECUENCIAS DE CEPAS INTERMEDIAS DE GANADO OVINO Y BOVINO.

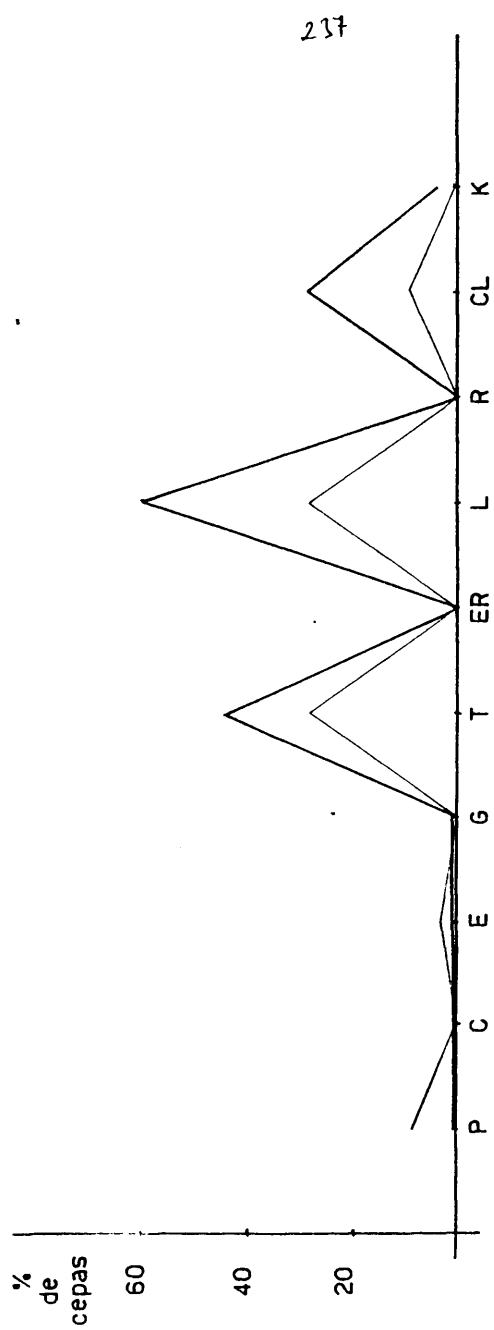


FIGURA AB-3: FRECUENCIA DE CEPAS RESISTENTES DE GANADO OVINO Y BOVINO.

zarla en el animal in vivo. Para ello nos servimos de los báre mos suministrados por Weinstein y col. (316, 317, 318) y el ma nual Boehringer (30), confeccionando la siguiente tabla farmaco cinética (tabla AB-7) sobre difusión y concentraciones plasmáti cas de cada antibiótico en un animal de 50 Kg de peso vivo que/ comparamos con las sensibilidades obtenidas por nosotros.

Así, en las figuras AB-4 y AB-5, hemos comparado los ha los y CMI medias de las dos poblaciones de cepas obtenidas en - ganado ovino y bovino con los valores a partir de los cuales - se las considera sensibles, que como puede comprobarse son in-- versamente proporcionales.

Como quiera que los resultados de los diversos antibio gramas realizados presentaban ciertas divergencias, hemos estudia do estadísticamente las dos poblaciones de cepas, comparando/ sus halos y CMI medias para comprobar si existía alguna forma - de homogeneidad entre las cepas aisladas a partir de heces ovi nas y bovinas.

Para ello y sirviéndonos de la tabla AB-8 hemos calcu lado las respectivas varianzas y desviaciones tipo, a partir de las cuales hemos obtenido el error "standard" de la diferencia de las medias y comprobado si se encuentra dentro del intervalo de confianza para un coeficiente de seguridad del 95%.

De este modo tenemos que las varianzas de los halos -- respectivos serían:

$$V_{hm \text{ ovi.}} = \frac{\sum f x_1^2}{n} - \bar{x}_1^2 = 11,41 ; \text{ siendo la desviación -}$$

típica

$$\sigma_{típica \text{ hm ovi.}} = \sqrt{11,41} = 3,73$$

$$V_{hm \text{ bov.}} = \frac{\sum x_2^2}{n} - \bar{x}^2 = 6,55; \quad \sigma_{hm \text{ bov.}} = \sqrt{6,55} = 2,55$$

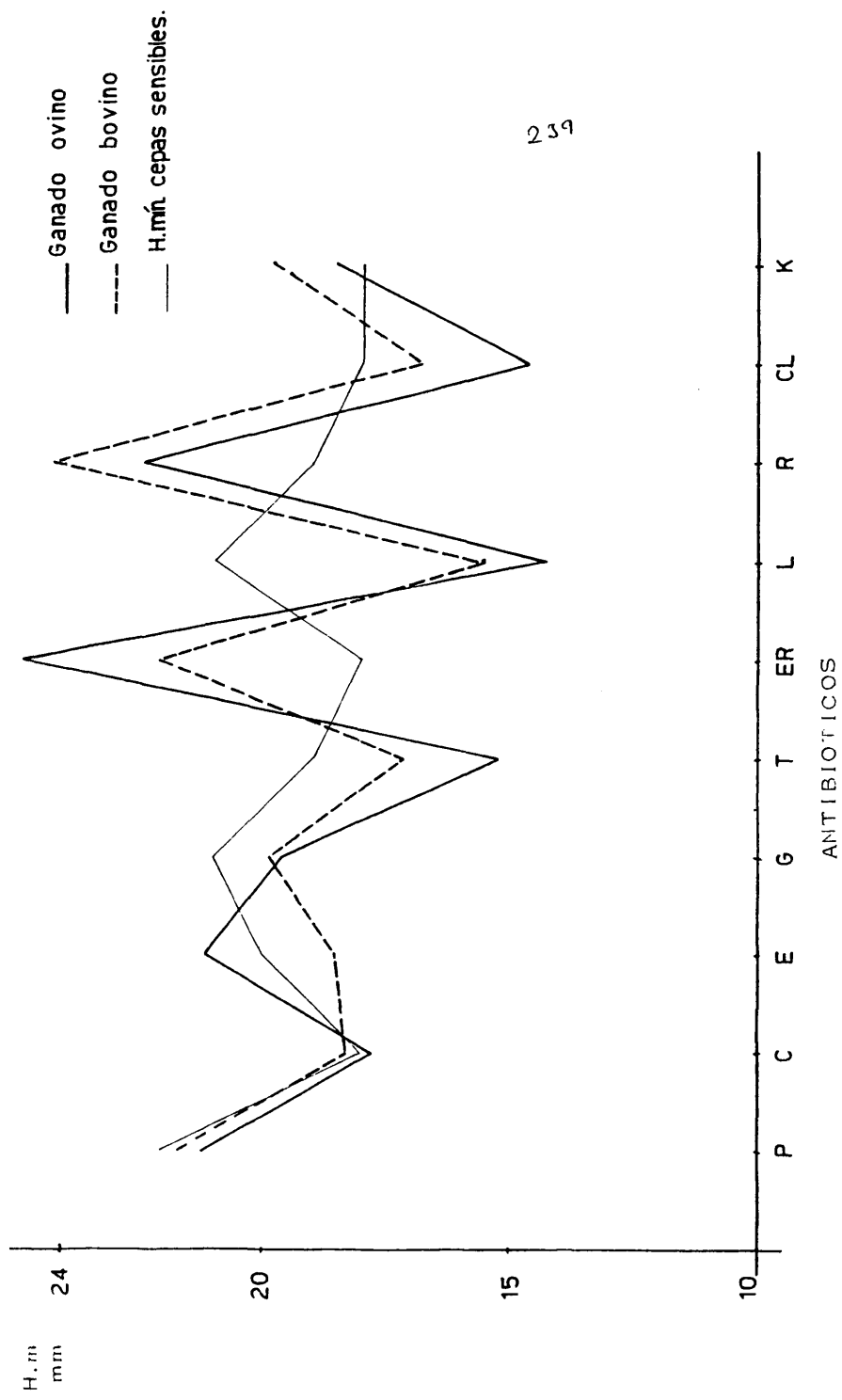


FIGURA AB -4: Halos medios de las distintas cepas encuestadas

— Ganado ovino.  
 - - - Ganado bovino.  
 — CMI m. cepas sensibles.

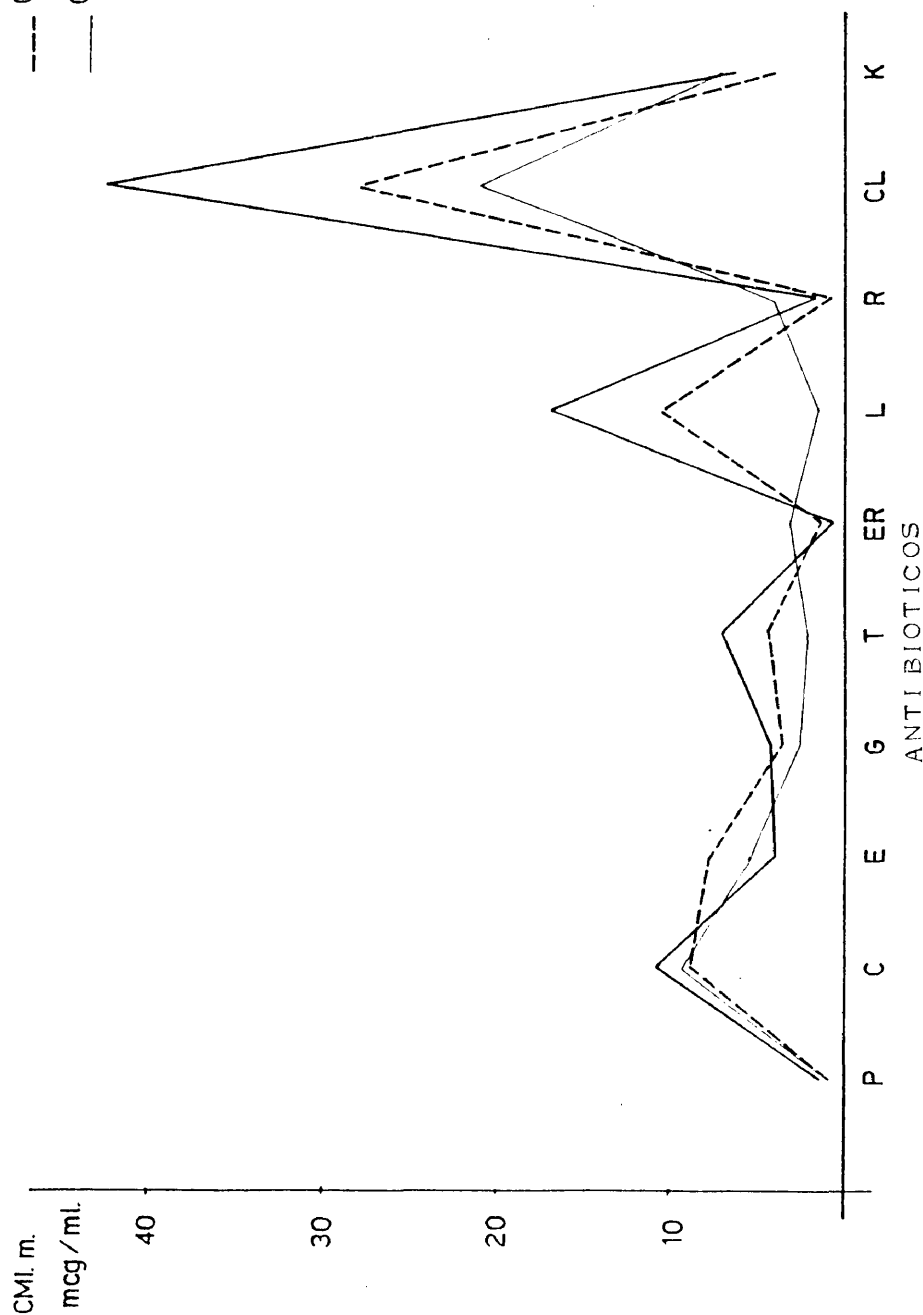


FIGURA AB -5: CMI media de las distintas cepas encuestadas

TABLA AB-8.

ANTIBIOTICOS	H. m ov.	CMI. m ov.	H. m bov.	CMI. m bov.	$f x^1_u$ ov.	$f x^2_{cm}$ ov.	$f x^1_u$ bov.	$f x^2_{cm}$ bov.
PENICILINA	21'18	1'23	21'69	1'14	27364'13	92'28	15054'59	41'58
CEFALOTINA	17'79	10'55	18'3	8'98	19305'53	6'89'45	10716'48	2580'49
ESTREPTOMICINA	21'07	4	18'58	7'72	27080'63	976	11046'92	1907'14
GENTAMICINA	19'65	4'16	19'9	3'86	23553'47	1055'64	12672'32	476'78
TETRACICLINA	15'26	6'96	17'18	4'22	14204'92	2954'93	9444'87	569'86
ERITROMICINA	24'8	0'5	22'08	1'03	37517'44	15'25	15600'84	33'94
LINCOMICINA	14'25	17'14	15'54	10'55	12386'81	17920'55	7727'73	3561'68
RIFAMPICINA	22'4	1'46	24'2	0'84	30607'36	130'02	18740'48	22'57
CLORANFENICOL	14'64	42'22	16'81	27'85	13074'10	108734'23	9042'43	24819'92
KANAMICINA	18'52	6'06	19'85	4'14	20922'41	2240'13	12608'72	548'46
	$\bar{x} =$ = 18'95	$\bar{x} =$ = 9'42	$\bar{x} =$ = 19'41	$\bar{x} =$ = 7'03	$\Sigma f x^1_u =$ = 226016'8	$\Sigma f x^2_{cm} =$ = 140908'4	$\Sigma f x^1_u =$ = 122655'3	$\Sigma f x^2_{cm} =$ = 34562'42



TABLA AB-7 : FARMACOCINETICA Y CONCENTRACIONES DE SENSIBILIDAD.

ANTIBIOTICOS	A	B	C	D	E	F	G	H
PENICILINA	10 <sup>6</sup>	0'12 - 12	40 - 60	1'5 - 2	℄	menos de 1	1'41 - 8	más de 10'55
CEFALOTINA	500	10 - 15	50 - 80	*	0'1 - 0'15	" 9'18	12'2 - 22'6	" 23
ESTREPTOMICINA	500	7 - 15	25 - 35	*	0'1 - 0'2	" 5'27	6'49 - 27'85	" 28
GENTAMICINA	200	3 - 6	25 - 30	*	0'2 - 2'9	" 2'82	3'73 - 10'55	" 11
TETRACICLINA	250	1'5 - 3	55 - 64	0'1 - 0'4	0'3 - 0'6	" 2'63	3'24 - 7'46	" 8
ERITROMICINA	500	2'5 - 6	20 - 40	0'62 - 1'25	0'8 - 1'4	" 3'03	4 - 8'57	" 9
LINCOMICINA	250	1'1 - 3'5	25	0'2 - 1	1 - 6	" 1'41	2'82 - 17'14	" 18
RIFAMPICINA	600	7 - 15	75 - 80	0'3 - 0'6	0'8 - 1'8	" 4	—	—
CLORANFENICOL	2000	20 - 40	45 - 60	4 - 9	6 - 20	" 21'11	25'99 - 59'71	más de 60
KANAMICINA	1000	10 - 35	25 - 30	indicios	0'5 - 2	" 6'96	9'18 - 19'69	" 20

A: Dosis en mg. vía intramuscular.

B: Concentración plasmática en mcg/ml

C: % conjugado con proteínas.

D: Concentración en líquido cefalorraquídeo en mcg/ml con meningitis normales.

E: Concentración en líquido cefalorraquídeo en mcg/ml con meningitis inflamadas.

F: CMI. admitida para las cepas sensibles en mcg/ml

G: " " intermedias " " "

H: " " resistentes " " "

\* : Inapreciable.

℄ : Dato no conocido.

El error "standard" sería:

$$Sd_1 = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_1^2}{n_2}}$$

Si comparamos las dos medias tenemos que:

$$t_2 = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sd} = 2,40$$

Para el caso de las CMI medias, nos encontramos igualmente con que

$$v_{CMI\ ovi.} = 142,11; \sigma_{CMI\ ovi.} = 11,92;$$

$$v_{CMI\ bov.} = 58,58; \sigma_{CMI\ bov.} = 7,65; \quad Sd_2 = 0,64 \text{ y } t_2 = 3,74$$

Como observamos, en ambos casos los resultados son superiores, aunque muy próximos a 2, valor de t para un coeficiente de seguridad del 95%, y por tanto cabe esperar que las diferencias encontradas no sean únicamente unas fluctuaciones fortuitas, sino que deben admitirse como diferencias significativas, y que realmente existe una discordancia, aunque no muy pronunciada, entre las dos poblaciones.

#### V.8. INOCULACIONES EXPERIMENTABLES EN ANIMALES DE LABORATORIO

Los resultados de las inoculaciones que se efectuaron con las 13 cepas patrón de distintos serotipos de L. monocytogenes de nuestra colección (13 hemolíticas y 5 no), quedan expresados en las tablas del I-1 al I-6, en que se han clasificado los resultados dependiendo de la especie animal inoculada y de la vía empleada.

También se han establecido diferencias entre los resultados obtenidos cuando la inoculación se practicaba con cepas hemolíticas y no hemolíticas, y entre el número de órganos en que se observaba algún tipo de lesión y de los que se obtenían cultivos positivos de L. monocytogenes. Se ha considerado también importante, y por eso se señala, el tiempo en horas que --tardaba en producirse la muerte a partir del momento de la inoculación, no computándose este tiempo en las medias cuando los animales fueron sacrificados.

En las tablas del I-8 al I-10 vienen expresadas las cifras totales de animales inoculados y muertos así como los aislamientos, mientras que en la tabla I-7 queda totalizado el número de animales muertos de los inoculados por cada vía con los órganos que resultaron más afectados.

Las cepas patrón de L. monocytogenes así como su serotipo y procedencia son las siguientes:

##### Cepas no Hemolíticas

Serotipo	Procedencia
4a .....	Seeliger
4ab .....	Seeliger
4c .....	Seeliger
6 .....	Ivanov
7 .....	Seeliger

ANIMALES	Nº	CEPA	m	S	T <sub>m</sub>	Nº ORGA. AFECTADOS						Nº CULT. POSITI.					
						C	R	H	B	I	O	C	P	H	B	R	
CONEJOS	26	h	26	0	28,3	26	22	26	7	1	4	26	15	26	25	16	
CONEJOS	10	nh	10	0	17,7	10	9	9	5	2	1	10	8	10	8	7	
COBAYAS	26	h	26	0	21,5	26	23	26	8	5	1	26	26	26	26	16	
COBAYAS	10	nh	10	0	23,2	10	10	10	5	4	0	10	10	10	10	9	
CRICETOS	26	h	26	0	20,1	26	12	26	2	3	1	26	14	24	22	17	
CRICETOS	10	nh	10	0	26,3	10	/	9	0	1	3	10	5	10	6	2	
RATONES	26	h	26	0	16,8	26	18	26	16	7	0	26	21	26	26	23	
RATONES	10	nh	10	0	18,7	10	10	10	7	1	0	10	9	10	9	8	

TABLA I-1: INOCULACIONES VIA SUBDURAL

ANIMALES	Nº	CEP.	m	S	Tm	Nº ORGA. AFECTADOS						Nº CULT. POSIT.					
						C	P	H	B	I	O	C	P	H	B	R	
CONEJOS	19	h	-	19	0	0	8	3	0	0	1	-	1	-	-	-	
CONEJOS	8	nh	-	8	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	
COBAYAS	26	h	6	20	104,6	-	7	8	3	-	1	-	6	3	3	3	
COBAYAS	10	nh	-	10	-	-	5	2	-	-	-	-	-	-	1	-	
CRICETOS	19	h	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CRICETOS	8	nh	1	7	118	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
RATONES	26	h	20	6	82,3	1	25	20	16	-	-	1	21	20	20	9	
RATONES	10	nh	3	7	149,4	-	7	4	1	-	-	-	3	3	1	1	

TABLA I-2; INOCULACIONES VIA SUBCUTANEA

ANIMALES	Nº	CEPA	m	S	Tm	Nº ORGA. AFECTADOS								Nº CULT. POSIT.				
						C	P	H	B	I	O	C	P	H	B	R		
CONEJOS	23	h	1	22	198	-	1	1	-	-	2	-	-	-	-	-		
CONEJOS	8	nh	0	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-		
COBAYAS	26	h	5	21	153,4	-	6	5	2	-	1	-	6	4	1	1		
COBAYAS	10	nh	1	9	172	-	-	1	1	-	-	-	1	1	1	-		
CRICETOS	23	h	1	22	116	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-		
CRICETOS	8	nh	0	8	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-		
RATONES	26	h	24	2	83,2	2	18	23	18	1	-	-	18	21	18	-		
RATONES	10	nh	5	5	89,3	-	4	5	5	-	-	-	4	5	5	-		

TABLA 1-3: INOCULACIONES VIA INTRAMUSCULAR

ANIMALES	Nº	CEPA	m	S	T <sup>m</sup>	Nº ORGA.						AFECTADOS				Nº CULT. POSIT.					
						C	P	H	B	I	O	C	P	H	B	R					
CONEJOS	19	h	-	26	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CONEJOS	8	nh	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
COBAYAS	26	h	2	24	98,3	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
COBAYAS	10	nh	-	10	-	-	4	1	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	
CRICETOS	19	h	-	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CRICETOS	8	nh	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RATONES	26	h	5	21	82,1	-	6	5	1	1	-	-	3	5	2	2	-	-	-	-	
RATONES	10	nh	-	10	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

TABLA I-4: INOCULACIONES VIA ORAL

ANIMALES	Nº	CEPA	m	S	Tm	Nº ORGA. AFECTADOS						Nº CULT. POSIT.					
						C	P	H	B	I	O	C	P	B	R		
CONEJOS	23	h	5	18	163,4	0	7	5	4	0	2	1	6	6	5	3	
CONEJOS	10	nh	1	9	120	0	2	2	4	0	0	0	1	1	1	1	
COBAYAS	26	h	8	18	105	0	8	8	8	0	0	0	8	6	6	1	
COBAYAS	10	nh	3	7	160	0	3	3	3	1	0	1	3	3	3	3	
CRICETOS	19	h	4	15	151,7	0	4	5	4	0	0	0	5	5	3	1	
CRICETOS	7	nh	0	7	-	0	3	4	4	0	0	0	2	1	1	2	
RATONES	26	h	26	0	69,2	3	26	26	26	0	0	4	26	26	26	24	
RATONES	10	nh	10	0	86,4	0	10	10	10	0	0	0	10	10	10	10	

249

TABLA 1-5: INOCULACIONES VIA INTRAPERITONEAL



ANIMALES	Nº	CEPA	m	S	Tm	VIA	Nº ORGA. AFECTADOS						Nº CULT. POSIT. :					
							C	P	A	B	I	O	C	P	H	B	R	
CONEJOS	26	h	5	21	110,4	IV.	1	5	6	5	-	2	1	5	5	5	5	
CONEJOS	10	nh	1	9	73	IV.	-	1	-	-	-	1	1	1	1	1	1	
CONEJOS	26	h	2	23	334,6	I.O	1	3	3	-	-	26	-	2	2	2	10	
CONEJOS	10	nh	-	10	-	I.O	-	1	-	-	-	10	-	-	-	-	-	
RATONES	26	h	5	21	116,8	IsC	-	4	5	2	-	26	-	2	5	4	4	
RATONES	10	nh	-	10	-	IsC	-	1	2	-	-	10	-	-	-	-	-	

TABLA 1-6: INOCULACIONES INTRAOCULARES E INSTILACIONES CONJUNTIVALES

CEFA	H	Nº INOCU.	NUMERO DE MUERTOS										ISC
			T	%	Sd	Ip	Sc	Im	Iv	Io	Vo		
Se 1/2a	h	46	18	39,1	8	5	2	2	0	0	0	1	
Iv 1/2a	h	46	13	28,2	8	2	0	2	0	1	0	0	
Se 1/2b	h	46	20	43,4	8	5	4	2	0	0	1	0	
Se 1/2c	h	38	14	36,8	8	2	2	2	0	0	0	0	
Se 3a	h	46	20	43,4	8	5	1	2	1	0	2	1	
Se 3b	h	38	15	39,4	8	2	3	2	0	0	0	0	
Se 3c	h	46	20	43,4	8	5	2	3	1	1	0	0	
Se 4a	h	36	14	38,8	8	3	1	1	1	0	0	0	
Se 4ab	h	45	11	24,4	8	2	0	1	0	0	0	0	

TABLA 1-7: CEPAS INOCULADAS

CEPA	H	Nº INOCUL	Nº DE MUERTOS									
			T	%	SD	IP	Sc	IM	IV	IO	VO	IsC
Se 4b	h	41	15	36,5	8	2	2	2	0	0	0	1
Iv 4b	h	46	25	54,3	8	4	2	6	2	0	2	1
Se 4c	nh	40	14	35	8	3	1	2	0	0	0	0
Se 4d	h	46	16	34,7	8	3	3	2	0	0	0	0
Se 4e	h	39	13	33,3	8	2	2	1	0	0	0	0
Se 5	h	40	15	37,5	8	2	2	2	0	0	1	0
Iv 5	h	46	19	41,3	8	4	1	3	1	0	1	1
Iv 6	nh	38	12	31,5	8	3	1	0	0	0	0	0
Se 7	nh	46	14	30,43	8	3	1	2	0	0	0	0

TABLA I-7: CEPAS INOCULADAS (Continuación)

ANIMALES	VIA	CEPA	m	Tm	Nº ORGANOS AFECTADOS						Nº CULTIVOS POSITIVOS					
					C	P	H	B	I	O	C	P	H	B	R	
94	IP	h	43	122,3	3	45	44	42	0	2	5	45	43	40	29	
37	IP	nh	14	122,1	0	18	19	21	1	0	1	16	15	15	16	
T=131	IP	h+nh	57	122,2	3	63	63	63	1	2	6	61	58	55	45	
26	IV	h	5	110,4	1	5	6	5	0	2	1	5	5	5	5	
10	IV	nh	1	73	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
T=36	IV	h+nh	6	91,70	1	6	6	5	0	3	2	6	6	6	6	
26	IO	h	2	334	1	3	3	0	0	26	0	2	2	2	1	
10	IO	nh	0	0	0	1	0	0	0	10	0	0	0	0	0	
T=36	IO	h+nh	2	334	1	4	3	0	0	36	0	2	2	2	1	

TABLA I-8: ORGANOS AFECTADOS EN LAS INOCULACIONES INTRAPERITONEALES INTRAOCULARES

ANIMALES	VIA	CEPA	m	T <sub>m</sub>	Nº ORGANOS AFECTADOS						Nº CULTI. POSITIVOS					
					C	P	H	B	I	O	C	P	H	B	R	
90	VO	h	7	90,2	0	7	5	1	5	0	0	4	5	2	2	
36	VO	nh	0	-	0	5	3	1	1	0	0	0	1	1	0	
T=126	VO	h+nh	7	90,2	0	12	8	2	6	0	0	4	6	3	2	
26	IsC	h	5	116,8	0	4	5	2	0	26	0	2	5	4	4	
10	IsC	nh	0	-	0	1	2	0	1	10	0	0	0	0	0	
T=36	IsC	h+nh	5	116,8	0	5	7	2	1	36	0	2	5	4	4	

TABLA 1-9: ORGANOS AFECTADOS EN LAS INOCULACIONES ORALES E INSTILACIONES CONJUNTIVALES

ANIMALES	VIA	CEPA	m	Tm	Nº ORGANOS AFECTADOS						Nº CULTIVOS POSITIVOS					
					C	P	H	B	I	O	C	P	H	B	R	
104	Sd	h	104	21,6	104	75	104	33	16	6	104	76	102	99	72	
40	Sd	nh	40	21,4	40	36	38	17	8	4	40	32	40	33	26	
T=144	Sd	h+nh	144	21,5	144	111	142	50	24	10	144	108	142	132	98	
98	Im	h	31	137,6	2	26	30	20	1	3	0	24	25	19	1	
36	Im	nh	6	130,6	0	6	7	6	0	0	0	5	7	6	0	
T=134	Im	h+nh	37	134,1	2	32	37	26	1	3	0	29	32	25	1	
90	Sc	h	26	93,4	1	40	31	19	0	2	1	28	23	23	12	
36	Sc	nh	4	133,7	0	13	6	1	1	0	0	3	3	2	1	
T=126	Sc	h+nh	30	113,5	1	53	37	20	1	2	1	31	26	25	13	

255

TABLA L-10: ORGANOS AFECTADOS EN LAS INOCULACIONES SUBDURAL SUBCUTANEA E INTRAMUSCULAR

## Cepas Hemolíticas

Serotipo	Procedencia	Serotipo	Procedencia
1/2a.....	Seeliger	4b .....	Seeliger
1/2a.....	Ivanov	4b .....	Ivanov
1/2b.....	Seeliger	4d .....	Seeliger
1/2c.....	Seeliger	4e .....	Seeliger
3a .....	Seeliger	5 .....	Seeliger
3b .....	Seeliger	5 .....	Ivanov
3c .....	Seeliger		

Además, se comprobó la patogenicidad en el ratón por vía intraperitoneal de 20 cepas de L. monocytogenes de origen bovino y 40 de L. monocytogenes, 40 de L. grayi, 12 de L. murrayi y 4 de L. denitrificans de origen ovino.

Como puede apreciarse en la tabla de resultados totales (I-11), de 769 animales inoculados por las distintas vías resultaron muertos 288, (37,4%). De estos, 223 habían sido inoculados con cepas hemolíticas (un 40,2% de los inoculados) y 65 lo habían sido con cepas no hemolíticas (30,2%).

En cuanto a los órganos afectados, el hígado fué el -- que más regularmente presentaba lesiones, hallándose alterado -- en 303 casos (39,4%), correspondiendo 228 a las cepas hemolíticas (41,1%) y 75 a las no hemolíticas (34,8%). El cerebro se -- encontraba lesionado siempre que la inoculación se practicó por vía subdural tanto con cepas hemolíticas como no. En todos los casos se producía una generalización de la enfermedad con una -- rápida septicemia y muerte, aislándose las listerias en otros -- órganos además del cerebro. Así se aislaron en el 100% de los cerebros, 75% de los pulmones, 98,6% de los hígados, 91,6% de -- los bazo y 68% de los riñones de los animales inoculados.

Lesiones y síntomas nerviosos sólo aparecieron en un -- 1,44% de los animales inoculados por otras vías correspondiendo los máximos con un 5,5% a los inoculados por vía endovenosa y --

ANIMALES	CEPAS	m	%	Tm	Nº DE ORGANOS AFECTADOS					
					C	P	H	B	I	O
554	h	223	40,2	128,2	112	205	228	122	22	67
215	nh	65	30,2	96,1	40	81	75	46	12	25
T. 769	h+nh	288	37,4	114,3	152	286	303	168	34	92

TABLA I-11: CIFRA TOTAL DE INOCULACIONES Y ORGANOS AFECTADOS



con un 4,5% a los que lo fueron por vía intraperitoneal.

En cuanto al número total de órganos con aislamientos/positivos de listerias, podemos observar en las tablas I-12, -- I-13 e I-14 que es sensiblemente distinto al número de órganos/afectados. Así, nos encontramos con un 36,0% de hígados que -- contenían listerias frente al 39,4% que encontramos lesionados; 31,5% frente al 37,1% de los pulmones. En el bazo se invirtieron los términos siendo mucho más alto el número de aislamientos (32,7%) que el número de órganos que encontramos lesionados en la necropsia (21,8%). En el caso de los cerebros, las cifras se pueden superponer: 19,89% de cerebros con aislamientos/positivos frente a 19,76% de animales que observamos con síntomas y lesiones nerviosas.

La cepa que resultó ser más patógena fué el serotipo 4b de las suministradas por Ivanov que fué capaz de producir la muerte en un 54,3% de los animales a los que fué inoculada, siguiéndole a continuación con un 43,4% los serotipos 3c y 1/2b de las cepas suministradas por Seeliger. La mortalidad mínima/la produjo el serotipo 4ab de las suministradas por Seeliger.

En líneas generales, mostraron una letalidad menor las cepas no hemolíticas, aunque algunas de ellas, en las que no -- nos fue posible demostrar capacidad hemolítica, resultaron más/patógenas que otras que sí mostraban esta característica.

En la figura I-1 hemos representado el polígono de frecuencias que refleja el porcentaje de animales muertos por cada una de las vías de inoculación, y en la figura I-2 el histograma de las frecuencias de animales muertos para cada una de las/cepas empleadas.

Nótese cómo algunas cepas no hemolíticas alcanzan niveles de patogenicidad mayor que algunas hemolíticas.

En las figuras del I-3 al I-5 pueden apreciarse por superposición la comparación entre el porcentaje de órganos que --

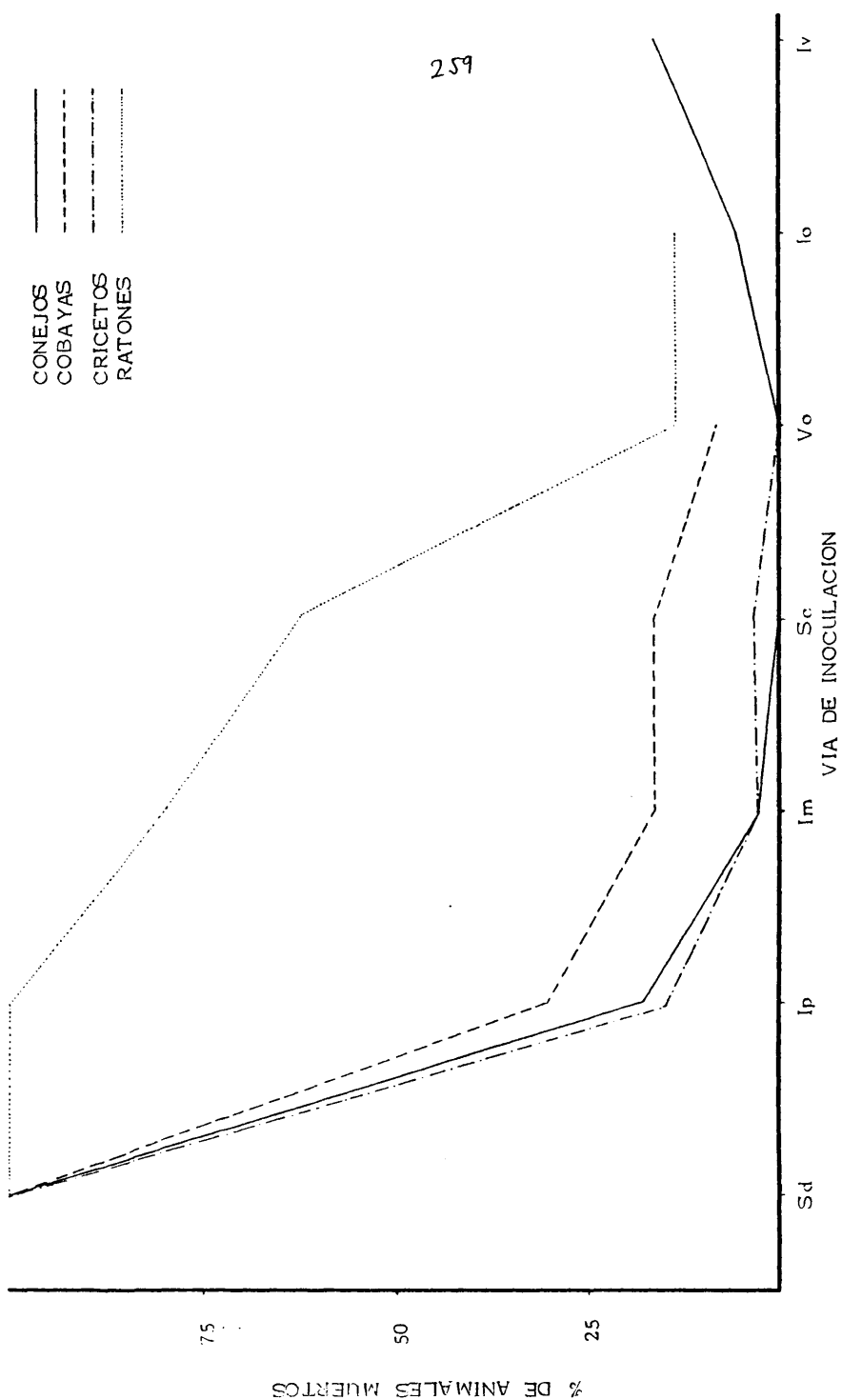
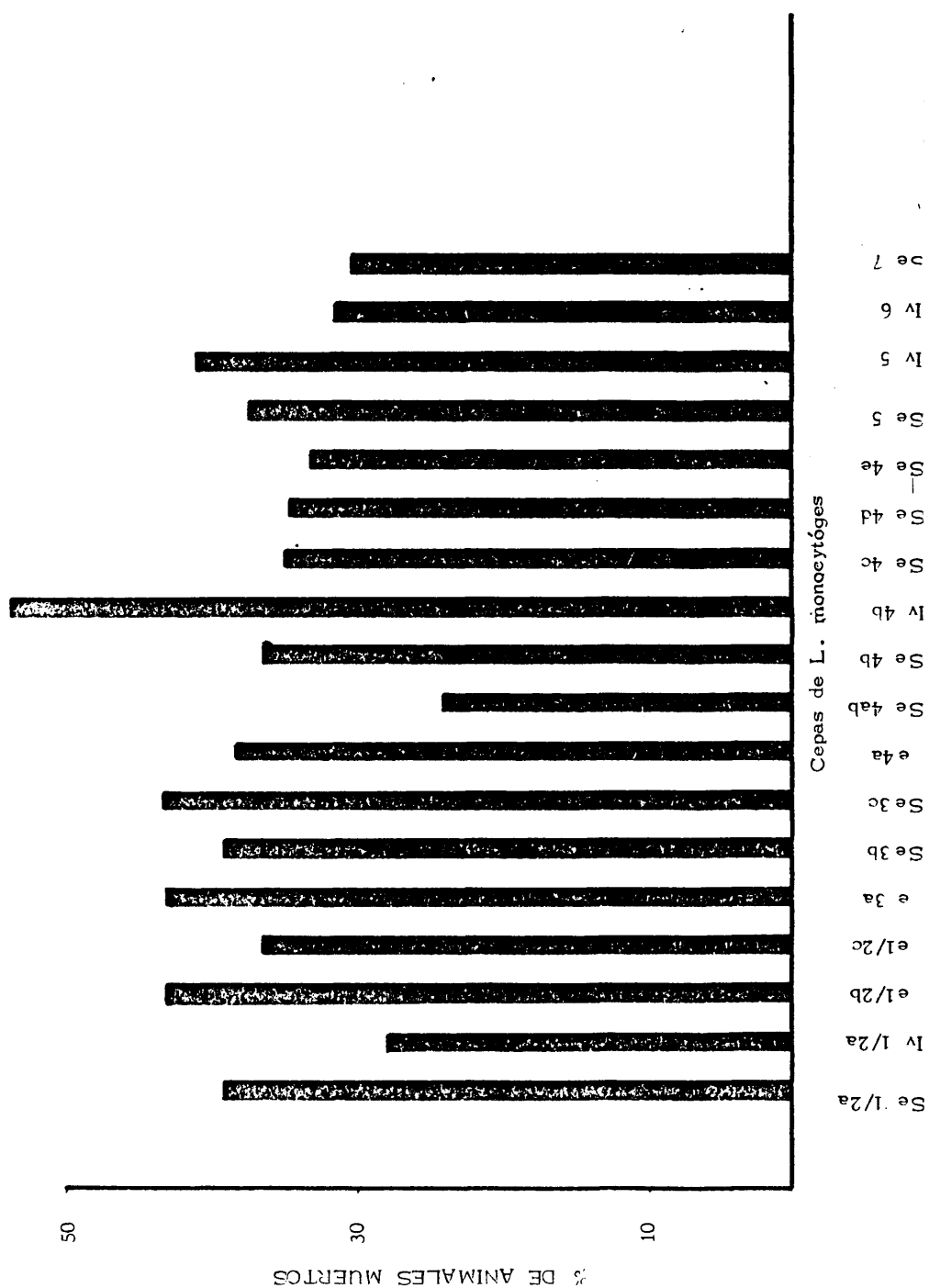


FIGURA 1-15 PORCENTAJE DE ANIMALES MUERTOS DEPENDIENDO DE LA VIA DE ADMINISTRACION

FIGURA 1-2: PORCENTAJE DE ANIMALES MUERTOS DEPENDIENDO DE LA CEPA INOCULADA



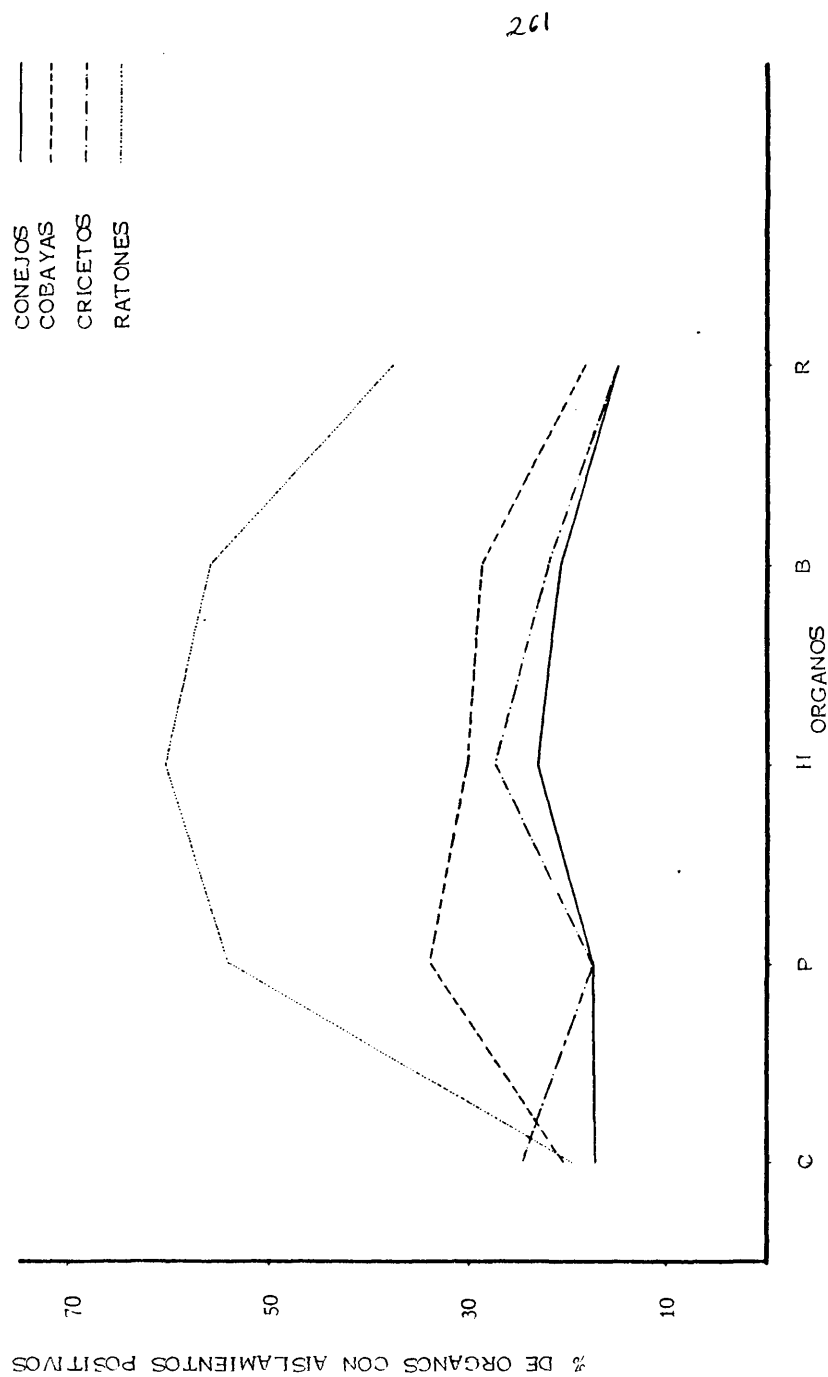


FIGURA 3: PORCENTAJE DE ORGANOS CON AISLAMIENTO POSITIVO EN LAS DISTINTAS ESPECIES

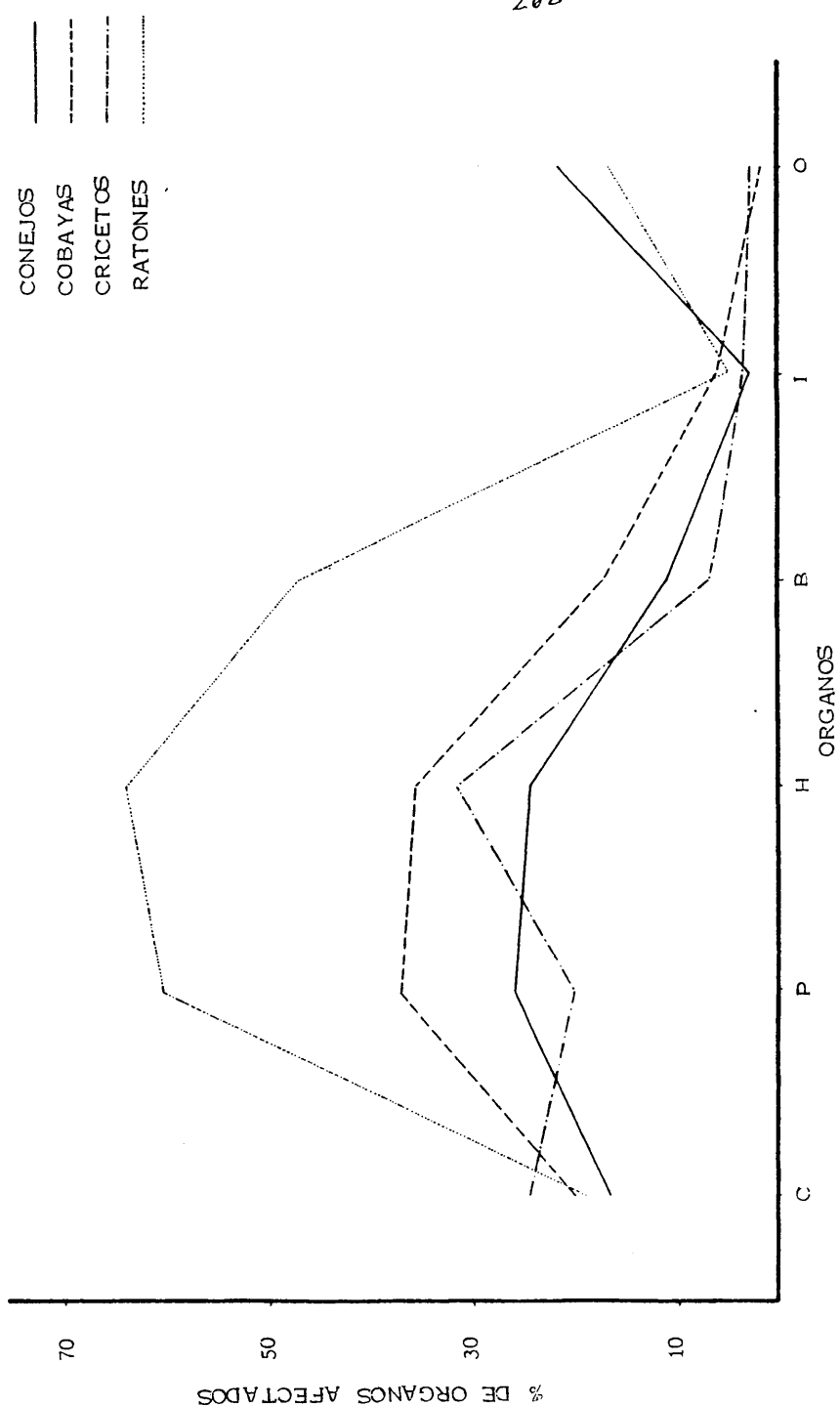


FIGURA 1-4: PORCENTAJE DE ORGANOS AFECTADOS EN LAS DISTINTAS ESPECIES

ORGANOS AISLAMIENTOS POSITIV. \_\_\_\_\_  
 ORGANOS AFECTADOS - - - - -

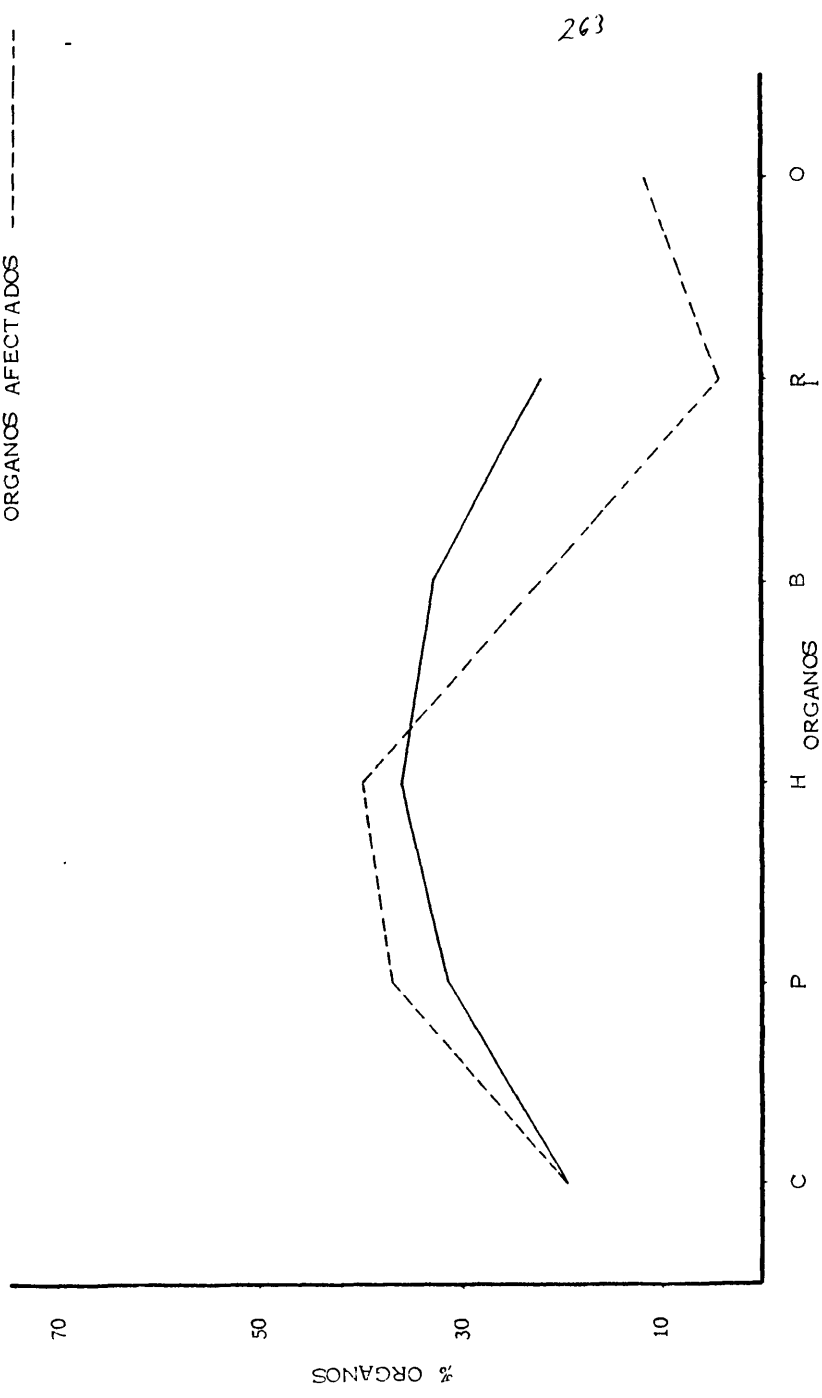


FIGURA 1-5: COMPARACION TOTAL DE ORGANOS AFECTADOS Y TOTAL DE ORGANOS CON AISLAMIENTOS POSITIVOS

ANIMALES	Nº	% DE ORGANOS AFECTADOS						% ORGANOS CON AISL. POSITI.					
		C	P	H	B	I	O	C	P	H	R	R	R
CONEJOS	226	16,8	26,1	24,3	11	3	21,6	17,2	17,2	23	20,7	15,0	
COBAYAS	180	20	37,2	35,5	17,2	6,1	1,6	20,5	33,8	30	28,8	18,3	
CRICETOS	147	24,4	20,4	31,2	6,8	3,4	2,7	24,4	17,6	27,2	21,7	14,9	
RATONES	216	19,4	60,1	63,8	47,2	5	16,6	18,9	54,1	60,6	56	37,5	
TOTAL	769	19,7	37,1	39,4	21,8	4,4	11,9	19,8	31,5	36	32,7	22,1	

TABLA I-12: PORCENTAJE DE ORGANOS AFECTADOS Y CON AISLAMIENTOS POSITIVOS

ANIMALES	INOCUL.	M	%	T <sub>m</sub>	Nº CULTIVOS POSITIVOS					
					C	P	H	B	R	
CONEJOS	226	51	22,5	130,6	39	39	52	47	34	
COBAYAS	180	61	33,8	104,7	37	61	54	52	33	
CRICETOS	147	42	28,5	86,4	36	26	40	32	22	
RATONES	216	134	62,0	79,4	41	117	131	121	81	
TOTAL	769	288	37,4	114,3	153	243	277	252	170	

TABLA I-13: TOTAL ANIMALES INOCULADOS Y TOTAL DE AISLAMIENTOS



TABLA I-14: CEPAS DE L. monovirgatus LETALES PARA LOS DISTINTOS ANIMALES DE LABORATORIO

266

ANIMAL.	INOC.	IV	Sd	IP	Im	Sc	IO	VO	IsC
CONEJOS		Se 3a(1) Se 3c(1) Se 4b(2) Se 5 (1) Se 4a(1)	TODAS	Se 1/2a(2) Se 3a(1) Iv 4b(1) Iv 5 (1) Se 4a(1)	Iv 4b(1)	NINGUNA	Se 3c(1) Iv 1/2a(1)	NINGUNA	N.P.
COBAYAS		N.P.	TODAS	Se 3a(2) Se 3c(2) Se 1/2b(1) Se 1/2a(1) Se 4c(1) Se 4d(1) Se 7 (1) Iv 4b(1) Iv 6 (1)	Se 4ab(1) Se 3c (1) Se 4e (1) Iv 4b (2) Iv 5 (1)	Se 3a(1) Se 1/2b(2) Se 3b (1) Se 4d (1) Iv 5 (1)	N.P.	Iv 4b(1) Iv 5 (1)	N.P.
CRICETOS		N.P.	TODAS	Se 1/2b(2) Se 3c(1) Iv 5(1)	Iv 4b(1)	Se 7(1)	N.P.	NINGUNA	N.P.
RATONES		N.P.	TODAS	TODAS	TODAS EXCEPTO Se 4a (1) Se 4ab(2) Se 4c (2) Iv 6 (2)	TODAS EXCEPTO Se 3a (2) Se 4a (1) Se 4ab(2) Se 4c (1) Se 7 (2) Iv 1/2a(2) Iv 5 (2)	N.P.	Se 3a(2) Se 1/2b(1) Se 5 (1) Iv 4b(1)	Se 1/2a(1) Se 3a(1) Se 4b(1) Iv 4b(1) Iv 5 (1)

nos encontramos afectados al realizar las necropsias y el porcentaje de órganos a partir de los cuales fuimos capaces de aislar la cepa inoculada.

También comprobamos la patogenicidad para el ratón de 20 cepas de L. monocytogenes de origen bovino y 40 de L. monocytogenes, 40 de L. grayi, 12 de L. murrayi y 4 de L. denitrificans de origen ovino, inoculadas por vía intraperitoneal a la dosis de 0,5 ml por animal de una suspensión de  $3 \times 10^8$  bacterias por mililitro.

Los resultados se exponen en la tabla I-15, donde además hemos reflejado los datos de las inoculaciones por vía intraperitoneal de las cepas patrones, con el objeto de poderlas comparar. Como puede apreciarse en la tabla, todas las cepas de L. monocytogenes, tanto patrones como las de origen ovino y bovino, resultaron mortales para el ratón en un plazo de 48 a 143 horas.

Sin embargo, ninguna de las cepas de las especies L. grayi, L. murrayi y L. denitrificans fueron capaces de producir la muerte de los ratones en las mismas condiciones.

Para concluir, si comparamos estadísticamente las 2 poblaciones de cepas hemolíticas y no hemolíticas, según su patogenicidad para los distintos animales de experimentación, nos encontramos con un porcentaje  $Q_e = 0,374$  para la distribución de la diferencia del porcentaje, siendo la varianza standard de la diferencia  $S^2_d = 0,0046$  y el error standard  $S^2_d = 0,067$ .

Como la diferencia de los porcentajes de las dos poblaciones es de 0,1 nos encontramos con que la relación de esta diferencia con su error "standard"  $T$  es igual a 1,49, inferior al límite  $T = 2$  para una seguridad del 95% de las desviaciones permitidas para simples fluctuaciones fortuitas.

No debe desecharse pues, la hipótesis de que las dife-

CEPA	ORIGEN	Nº INOCULADA	m	Tm	%	VIA	Nº BACTER.
L. monocytogenes	BOVINO	20	20	85,3	100	Ip	$1,5 \cdot 10^8$
L. monocytogenes	OVINO	40	40	105,2	100	Ip	$1,5 \cdot 10^8$
L. grayi	OVINO	40	0	-	0	Ip	$1,5 \cdot 10^8$
L. murrayi	OVINO	12	0	-	0	Ip	$1,5 \cdot 10^8$
L. denitrificans	OVINO	4	0	-	0	Ip	$1,5 \cdot 10^8$
L. monocytogenes	PATRON h	26	26	69,2	100	Ip	$1,5 \cdot 10^8$
L. monocytogenes	PATR. nh	10	10	86,4	100	Ip	$1,5 \cdot 10^8$

TABLA I-15: TOTAL DE CEPAS INOCULADAS

rencias observadas en las dos poblaciones sean debidas simplemente al azar.

Si comparamos las cuatro poblaciones animales ensayadas con respecto a su respuesta frente a las inoculaciones con L. monocytogenes, nos encontramos con que la dispersión total de los resultados alrededor de la media general es  $S^2_t = 4590,25$  con 22 grados de libertad.

La dispersión factorial es  $S^2_f = 857,8$  con 3 grados de libertad, y la dispersión residual  $S^2_r = 3732,4$  con 19 grados de libertad, encontrándonos por tanto con una varianza factorial

$$U_f = \frac{857,8}{3} = 285,6 \text{ y una varianza residual}$$

$U_r = \frac{3732,4}{19} = 196,4$ . Si comparamos estas dos varianzas nos encontramos con que su relación es  $\frac{U_f}{U_r} = 1,45$  y por tanto inferior al valor F de la tabla de Snédecor, que para los grados de libertad de  $V_1 = 3$  y  $V_2 = 19$  es de 3,12 para un coeficiente de seguridad del 95%.

Luego, podemos admitir que las fluctuaciones pueden ser debidas al azar y que existe una uniformidad de respuesta frente a las inoculaciones con L. monocytogenes.

Abreviaturas empleadas

nº = Número de animales inoculados.  
h = Cepa hemolítica.  
nh = Cepa no hemolítica.  
m = Número de animales fallecidos.  
s = Número de animales sacrificados.  
Tm = Tiempo medio en horas transcurrido entre la inoculación y  
fallecimiento.  
C = Cerebro.  
P = Pulmón.  
H = Hígado.  
B = Bazo.  
I = Intestino.  
O = Ojo.  
R = Riñón.  
Sd = Inoculación subdural.  
Iv = Inoculación intravenosa.  
IP = Inoculación intraperitoneal.  
Im = Inoculación intramuscular.  
Sc = Inoculación Subcutánea.  
IO = Inoculación Intraocular.  
VO = Vía oral.  
IsC = Instilación Conjuntival.  
N.P. = No probado.  
T = Total.

#### V.9. OBSERVACIONES MICROSCOPICAS Y ULTRAMICROSCOPICAS

A continuación pasamos a describir las lesiones más -- frecuentemente observadas en las preparaciones histológicas -- que se obtuvieron a partir de los distintos órganos estudiados/ (cerebro, hígado, bazo, pulmón y riñón) en los animales que fueron inoculados experimentalmente con L. monocytogenes.

Cerebro.-- En este órgano suelen aparecer, en los casos en que existe lesión, focos inflamatorios con linfocitos, - neutrófilos y abundantes macrófagos. Las neuronas muestran en/ estos casos signos evidentes de degeneración a nivel de mitocondrias, con desaparición de crestas y de matriz. Los núcleos aparecen muy lesionados con los poros de la membrana nuclear muy/ agrandados y cromatorrexis (fotografías números 39 y 40).

A pesar de estas lesiones, en ningún momento hemos observado bacterias en los cortes de este órgano.

Hígado y Bazo.-- Tampoco se observaron bacterias en -- ninguna de las piezas que preparamos a partir de estos órganos, aunque invariablemente aparecían lesionados en casi todos los - casos en que se produjo la muerte de los animales inoculados. Siendo la lesión predominante la de pequeños focos necróticos - con gran infiltración de linfocitos y neutrófilos.

Pulmón.-- Tanto la microscopía óptica como la electrónica nos han puesto de manifiesto reiteradamente la presencia de/ abundantes bacterias en este órgano, algunas veces localizadas/ en el interior de los macrófagos (fotografías números 37 y 38).

Este órgano suele mostrar frecuentemente grandes zonas congestivas con abundantes hemorragias, destrucción de parénquima en algunas partes y posterior organización conjuntiva.

Riñón.-- En las secciones de riñón observadas se sue--

len apreciar, fundamentalmente, lesiones en las células epiteliales de los túbulos, en las luces tubulares y en el intersticio (fotografías números 35 y 36).

Las células epiteliales muestran, en estos casos, los tubos contorneados segunda porción con una degeneración turbia/mitocondrial, con borramiento de crestas y aumento de matriz; - apareciendo, los núcleos, algunas veces, desplazada hacia la zona luminal.

Las luces tubulares suelen mostrar en su interior partes de células formando cilindros granulosos. El intersticio - puede aparecer con una gran dilatación vascular (enormemente -- congestivo). También suelen ser frecuentes las hemorragias y - edemas. No hemos observado bacterias en ninguna de las muestras de este órgano.

## VI. DISCUSION

### VI.1. DE LAS CARACTERISTICAS DE LOS CULTIVOS EN LOS DIVERSOS MEDIOS EMPLEADOS.

Es un hecho muy claro que uno de los aspectos fundamentales en los que se basa la detección y el aislamiento de los microorganismos del género Listeria, es la estructura y morfología de las colonias (Gray y col., 133). De ahí la importancia de poder distinguir de manera eficaz, las colonias de listerias de entre aquellas que corresponden a diversos microorganismos con el mismo "habitat" (Despierre, 71).

Por tanto, no es de extrañar que todo nuestro empeño a la hora de confeccionar unos medios adecuados para el aislamiento de listerias, estuviera encaminado a conseguir que éstos tuvieran la suficiente selectividad como para no permitir el crecimiento y multiplicación de los gérmenes que normalmente contaminan los cultivos de listerias y que, sin embargo, permitieran el desarrollo de la mayoría de estirpes de las distintas especies del género.

Al mismo tiempo no olvidamos un proposito fundamental para nosotros, cual era conseguir unos medios de aislamiento que permitieran una rápida visualización y selección de las presumibles colonias sospechosas. A esta tarea nos dedicamos, si cabe, más intensamente que a la anterior.

Otro aspecto importante a tener en cuenta, son los tiempos necesarios para obtener resultados positivos en los distintos cultivos, que en la técnica habitual de enriquecimiento a 4°C supone hasta un año (Kampelmacher y col., 171).

Por estos motivos se eligieron unos medios de recogida/nutritivamente bastante pobres, sin ningún tipo de sustancia inhibidora, y en los que la potenciación del crecimiento de gérme-



nes del género Listeria, se basa exclusivamente en la facilidad/ que tienen estos microorganismos para crecer a 4°C (Gray y col., 123), y en la adición de azúcares más fácilmente utilizables por las listerias que por el resto de flora entérica. De ahí que al ser medios mínimos se esté potenciando únicamente el crecimiento de los gérmenes que puedan multiplicarse a estas temperaturas, - utilizando para ello la energía de los azúcares añadidos.

Asímismo, y debido a la tremenda labilidad de las listerias a los pH ácidos, se tamponaron con fosfatos los distintos medios, para evitar que la acidez producida por la utilización - de los azúcares pudiera afectar a la viabilidad de las listerias (Shahamat, 286).

La utilización de tres medios de composición parecida, / pero con distintos azúcares, se hizo con la finalidad de que la / mayoría de las especies de listerias que pudiera haber en las -- muestras utilizaran alguno de ellos. Manteniendo continuamente, incluso durante la recogida y transporte de muestras, todos los / medios a 4°C para impedir que por un incremento de la temperatura se pudieran multiplicar otros gérmenes.

Los medios de enriquecimiento, al contrario que los de / recogida, son medios muy selectivos por la adición de bastantes / sustancias inhibidoras y a bastante concentración. Siendo por - otra parte muy ricos en sustancias nutritivas, para permitir un / rápido crecimiento de todas las cepas que pudieran crecer en presencia de los inhibidores añadidos. Asímismo, se encontraban - tamponados para evitar los efectos indeseables de los pH ácidos.

Como sustancias inhibidoras se añadían ácido nalidíxico, polimixina B, tripán azul y cloruro sódico a alta concentración / y cuya acción será ampliamente comentada posteriormente en este / mismo capítulo.

Como sustancias enriquecedoras se les han añadido a los distintos medios las siguientes:

- Distintos tipos de peptonas, triptonas y extractos de carne obtenidos mediante digestión especial y que permiten una fácil asimilación por parte de todo tipo de gérmenes (73).

- Extracto de levadura, sustancia muy rica en vitaminas del grupo B y aminoácidos azufrados, que facilitan e incrementan/ el crecimiento de gérmenes del género Listeria, por complementar los nutrientes existentes en los hidrolizados cárnicos.

- Fosfatos como sustancias tampón, que al impedir que el pH se acidifique en exceso, protegen a las posibles listerias/ que pudiera haber en el medio, del efecto perjudicial de la acidez.

- Azúcares fácilmente utilizables por las listerias, como son:

- Ramnosa: Azúcar utilizado por un porcentaje alto/ de listerias de las especies L. monocytogenes y L. murrayi (Bergey's Manual , 43, Despierrez, 71, -- Kampelmacher y col., 175).
- Esculina: Glucósido fácilmente utilizado por todas las especies del género Listeria (Buttiaux y/ col., 46, Seeliger y col., 284).
- Glucosa: No solamente sirve como sustancia energética, sino que además las listerias en su presencia, se rodean de una cápsula mucopolisacárida (Smith y col., 294, Seeliger y col., 284) -- que les confiere un cierto grado de protección -- frente a la acción de determinados agentes agresores, (la polimixina B, entre ellos).

Además se utilizó una temperatura de incubación de 22°C.

A esta temperatura las listerias se desarrollan perfectamente -- (286) en cambio, está disminuida la multiplicación de otros gérmenes mesófilos que pudiera haber en las heces.

En el medio C de enriquecimiento además de todo lo ante

riormente descrito, se utilizó un medio de movilidad selectiva - distribuido en tubos de Craigie (51), para seleccionar de entre/ aquellas bacterias que hubieran podido crecer en estas condiciones, solamente las móviles.

Como medios de aislamiento disponíamos de dos medios, - extensamente probados y de una utilidad reconocida por los diversos autores: el Agar sangre nalidíxico (Beerens y col., 19) y el Agar suero nalidíxico tripaflavina (Ralovich, 249).

Ahora bien, estos medios presentan un grave inconveniente: El Agar suero nalidíxico tripaflavina es excesivamente selectivo, por lo que no permite el desarrollo de todas las especies - del género, y el Agar sangre nalidíxico al contrario, es un medio poco selectivo y en el que normalmente las colonias de listerias aparecen enmascaradas por el resto de gérmenes que crecen - sobre él cuando el inóculo está muy contaminado (Kampelmacher y col., 173, Despierrez, 71, Forray, 105).

Para obviar estos inconvenientes nos planteamos la posibilidad de desarrollar otros medios que, inhibiendo el crecimiento de los gérmenes que habitualmente se encuentran en las heces, nos permitieran sin embargo, un óptimo crecimiento de todas las especies del género.

En esta línea de trabajo, primeramente se probaron - - otros medios de aislamiento descritos en la bibliografía, como - el Agar telurito potásico ácido nalidíxico (Khan y col., 180) y/ Agar ramosa ácido nalidíxico polimixina B (Despierrez, 71), -- ambos de escasa selectividad, y que presentan algunos problemas/ a la hora de seleccionar morfológicamente las posibles colonias/ de listerias. Ante esta situación nos propusimos modificar los/ medios existentes, a fin de mejorar sus rendimientos.

La primera medida que se tomó tras una serie de ensayos de orientación, fué sustituir en el Agar suero nalidíxico tripaflavina, el suero por una cantidad equivalente de sangre de car-

nero, lo cual favorecía la labor de selección de colonias al presentar éstas contrastes más netos. Si bien, debido a la opacidad del medio, tuvimos que modificar la técnica de selección de colonias empleando la epiiluminación, en lugar de la transiluminación (Gray y col., 133). En segundo lugar, rebajamos la concentración de acriflavina (que era la sustancia que nos inhibía el crecimiento de L. murrayi y L. grayi) a una concentración de 12 mg/l. En tercer lugar, le añadimos glucosa al 0,1% para facilitar el crecimiento. Y por fin tamponamos el medio con fosfatos, para impedir que la acidez perjudicara el mantenimiento de las cepas sobre las placas.

Con el fin de incrementar la información aportada por estos medios, se añadió a otro de ellos esculina como único carbohidrato utilizable, y un indicador de su utilización, el citrato amónico férrico (46). Por último, se agregó a un tercero polimixina B y cloruro sódico como inhibidores con el fin de incrementar su selectividad (286).

En cuanto a la utilidad y la eficacia de nuestra metodología y medios de cultivo, se pueden apreciar fácilmente por los resultados obtenidos en la tercera etapa de aislamientos, en la que comparamos las dos técnicas, encontrándonos que mientras por la técnica clásica se aislaron 11 estirpes de tres especies, con la técnica modificada, se aislaron 116 estirpes de las cuatro especies. El rendimiento de nuestra metodología por tanto, fué 10 veces superior.

Este rendimiento de los medios modificados, no es uniforme para todas las especies; y así, nos encontramos que mientras la especie L. denitrificans se aísla igual con uno y otro método, L. monocytogenes se aísla con una probabilidad superior en 4:1 - mientras que en L. grayi la relación sería de 40:1 y en L. murrayi resultaría infinitamente más adecuada la técnica modificada ya que no se aisló en ningún caso por la técnica clásica.

Los resultados obtenidos para los aislamientos de L. monocytogenes son extrapolables a los obtenidos en coprocultivos humanos y animales en otros laboratorios, (71, 76, 114, 115, - - 175) en que cifras alrededor del 20% de portadores son habituales. Nada podemos afirmar en cambio para las otras tres especies, dado que no tenemos referencias de ningún tipo de aislamiento, únicamente Ivanov (159b) nos comunicó que no se aislaban regularmente con las técnicas habituales.

El tiempo de enriquecimiento también es digno de tenerse en cuenta. Así, mientras nosotros obtenemos una proporción de aislamientos elevada durante el primer mes, mediante la técnica clásica estos porcentajes se alargan hasta el cuarto o el quinto (Kampelmacher, 175). Despierres (71) afirma que con la utilización de su medio de enriquecimiento a Tª de 37°C, aísla listerias en 5 ó 7 días, circunstancia que no hemos podido corroborar, pues con estas temperaturas de incubación jamás hemos aislado listerias a partir de su medio de enriquecimiento.

En cuanto a los medios de recogida, podemos decir que - el 61% de las cepas se aisló a partir del medio de recogida A, - el 18% a partir del medio B y el 12% a partir del medio C. Aunque estos resultados no son ningún índice fiable, ya que los aislamientos se hicieron con más frecuencia a partir del medio A - que a partir de los otros dos, hubo un 9% de las cepas que se aislaron a partir de los tres medios y en cambio, solamente un - 3,1% se aislaron a partir de dos de ellos.

En un estudio pormenorizado por especies, observamos -- que el 80% de L. monocytogenes se aislaron a partir del medio de recogida A, el 16% a partir del B y el 4% a partir del C, mientras que L. murrayi fué aislada al 100% a partir del medio A y - L. denitrificans al 100% a partir del medio C.

En cuanto a la proporción de los resultados obtenidos a partir de los medios de enriquecimiento y sobre los de aislamiento

to, no podemos ofrecer cifras comparativas, ya que se emplearon/  
con mayor frecuencia los medios C, que eran los que más fácilmen  
te manejamos, empleando los otros (tanto los de enriquecimien-  
to como los de aislamiento) cuando las muestras eran negativas en  
varios aislamientos. Si es en cambio una cifra significativa --  
las 11 cepas aisladas, sobre lo que nosotros hemos venido en lla-  
mar medios clásicos, frente a las 116 aisladas sobre nuestros me-  
dios.

## VI.2. DE LOS AGENTES INHIBIDORES

La adición de sustancia inhibidoras a los medios de cultivo, con el objeto de limitar el desarrollo de microorganismos no deseados, es un tema que siempre ha estado sometido a grandes discusiones. No solamente se ha cuestionado si el empleo de una u otra sustancia era conveniente, sino también, la necesidad de utilizar o no sustancias inhibidoras (115, 124, - 125, 250, etc.).

En el caso concreto del género que nos ocupa, existe un hecho evidente, pensamos que compartido por todos los autores: aislar listerias de material fuertemente contaminado es - una labor prolija y que no siempre da resultados positivos, a no ser que se empleen sustancias inhibidoras de la flora contaminante (71).

Este es el motivo por el que se han venido ensayando desde un principio multitud de sistemas y de sustancias para - conseguir un crecimiento diferencial por parte de las listerias en las muestras contaminadas.

La cantidad de sustancias inhibidoras ensayadas es - ingente, y sería largo y tedioso discutir en este apartado el empleo de cada una de estas sustancias o técnicas. Sin embargo, y como hemos comparado la utilidad de algunas de ellas, vamos a pasar a continuación a discutir desde nuestro punto de - vista y a la luz de la extensa bibliografía al respecto, la - conveniencia de utilizar unos u otros agentes para el aislamiento.

### VI.2.1. Agentes físicos

Desde que Gray en 1.948 (123) observó que la capacidad de las listerias para crecer a bajas temperaturas podría - servir para potenciar el crecimiento de estos gérmenes frente a los microorganismos mesófilos que normalmente contaminan las

muestras, se ha venido empleando esta técnica sin que nadie -- discutiera su utilidad. El enriquecimiento de las muestras a  $4^{\circ}\text{C}$  es una práctica empleada por todos los investigadores del mundo con una sola objeción: es un proceso largo y tedioso que complica y alarga excesivamente los aislamientos (seis meses y más), pero que rinde muy buenos resultados (204).

Nosotros hemos elegido ~~un~~ sistema mixto de incubación. La temperatura de enriquecimiento y aislamiento empleada fue de  $22^{\circ}\text{C}$ , puesto que a ella las listerias se desarrollan francamente bien (casi como a  $37^{\circ}\text{C}$ ), llegando los cultivos a alcanzar la fase estacionaria de crecimiento a las 24 horas en lugar de las 14 ó 16 que necesitan cuando se cultivan a  $37^{\circ}\text{C}$  -- según Shahamat y col., (286). Muchos de los gérmenes mesófilos del intestino tienen, ciertamente disminuida, su capacidad de crecimiento a esta temperatura, y por tanto, podemos obtener un cierto crecimiento diferencial de las listerias.

Por otra parte, no quisimos dejar de lado una técnica que viene dando tan buenos resultados como es el enriquecimiento a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para ello sometimos los diferentes coprocultivos a esta  $T^{\circ}$ , tanto durante la toma de muestras como durante el transporte. Así se evitaba en estas primeras horas, que podrían resultar cruciales, que los medios adquiriesen unas temperaturas tales que permitieran un fácil desarrollo de otros gérmenes, con el doble inconveniente de agotar los nutrientes y -- disminuir más la proporción de listerias.

De esta forma, siempre teníamos un remanente de todas las muestras en su medios de recogida a  $4^{\circ}\text{C}$ , por si los aislamientos más rápidos que intentábamos a  $22^{\circ}\text{C}$  nos resultaban negativos.

Existen otros dos agentes físicos, pH y concentración osmótica, de los que todavía se sigue discutiendo si son o no aplicables a la selección de microorganismos del género.



Está descrita la supervivencia de L. monocytogenes durante un año a concentraciones de cloruro sódico del 16% -- (307), 8 semanas al 20% (43) y más de 130 días al 20,5% (286), ahora bien, la supervivencia en estas concentraciones salinas se verifica siempre que los cultivos permanezcan a 4°C. Siendo muy importante este dato, no se ha encontrado apenas diferencia entre la acción de concentraciones de cloruro sódico -- del 10,5% o del 20,5% cuando las bacterias permanecían a 4°C. Además, supervivencia es una cosa y capacidad de multiplicación otra muy distinta, y así se ha observado que concentraciones del 7% permiten vivir a algunas cepas pero no multiplicarse, mientras que concentraciones del 5% a 6°C las permiten vivir y multiplicarse (Beganovic y col., 20).

Gómez-Mampaso y col., (116) obtienen cifras más altas en cepas de origen humano y consiguen multiplicar un 80% de las 141 cepas probadas en una concentración de cloruro sódico del 10%. Nosotros sin embargo, obtenemos en cepas de origen animal cultivadas a 22°C; resultados muy parecidos a Beganovic y col., (20), pues mientras a concentraciones salinas -- del 5% obtuvimos crecimiento en todas las cepas, con un 7% de cloruro sódico sólo nos crece un 74,6% bajando la proporción a un 23,8% cuando la concentración es del 9%. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por Kramer y col., 1.969(186), quienes observaron que concentraciones del 3 al 5% de cloruro sódico inhibían el crecimiento de algunos microorganismos del género. Wilkinson y col., (323b) constatan crecimiento en el 97% de las cepas de L. monocytogenes y en el 100% de L. grayi y L. murrayi a concentraciones de cloruro sódico del 10%. Ahora bien, hemos de tener en cuenta que estos autores -- emplean un medio líquido para observar el crecimiento. Pensamos, por tanto, que las condiciones no son extrapolables por -- ser más fácil obtener crecimiento en los medios líquidos y --

existir menos problemas de incremento de la concentración salina por evaporación de los medios durante el almacenamiento/ o la incubación.

En base a lo expuesto, podría afirmarse que los medios sólidos de cultivo no deben contener más allá del 5% de cloruro sódico so pena de inhibir el crecimiento de bastantes cepas, por lo menos en las muestras de origen fecal. Butko (47) recomienda por el contrario, incorporarlo en concentraciones del 7,5 al 8% para inhibir el crecimiento de algunas bacterias como E.coli, Corynebacterias, estreptococos beta-hemolíticos, Bacillus Subtilis y Proteus Sp, bacterias que, por otra parte, pueden ser fácilmente inhibidas con la incorporación de otras sustancias menos tóxicas para las listerias.

Lo cierto es que el empleo de altas concentraciones de cloruro sódico en los medios de cultivo como agente inhibidor único, no se viene utilizando en la actualidad. No obstante, la halotolerancia puede utilizarse como un agente inhibidor complementario o como una prueba fisiológica más para caracterizar las distintas cepas.

En cuanto a la capacidad para crecer a distintos -- pH, todos los autores se muestran de acuerdo en cuanto a la -- labilidad de los microorganismos del género en pH ácido, y la mayor aptitud para crecer a pH neutros o ligeramente alcali-- nos. Así están ampliamente descritos como pH óptimos los comprendidos entre 7 y 7,5 con posibilidad de crecimiento hasta/ pH 9 y la imposibilidad del mismo por debajo de 5,6 (43, 286, 46, 66, etc.). Nosotros hemos observado que el periodo de supervivencia de las distintas cepas de listeria en los medios/ que contienen carbohidratos se acorta a unas pocas semanas -- cuando no están tamponados, por la fuerte acidificación que -- sufren éstos al metabolizarse el azúcar. En estos mismos me-- dios cuando están tamponados, la supervivencia se alarga has--

ta meses cuando permanecen a 4°C.

Existe, lógicamente, una adición de los efectos producidos por estos 3 agentes cuando se emplean conjuntamente; - así se ha observado que concentraciones altas de cloruro sódico con pH bajos y temperaturas de incubación de 37°C detienen el crecimiento, mientras que estas mismas condiciones a temperaturas de 4° y 6°C son mucho mejor soportadas (286), siendo - la temperatura de 22°C aquella en la que no se produce excesivo retardo en el crecimiento listeriano y soporta bastante - - bien la acción negativa del cloruro sódico y el bajo pH.

#### VI.2.2. Agentes químicos

La incorporación de sustancias químicas inhibidoras a los medios de cultivo de listerias comenzó con la adición - de telurito potásico al 0,05% en los medios de enriquecimiento y de aislamiento debido a las recomendaciones sugeridas por Gray y col., en 1.950 (124).

Muchos inconvenientes se han planteado a la utilización de esta sustancia al 0,05% en los medios para listerias, sobre todo por inhibir el crecimiento de algunas cepas a concentración del 0,05% (Olson y col., 224), y no inhibir el crecimiento de géneros bacterianos como Streptococcus y Staphylococcus que normalmente se presentan contaminando los coprocultivos de listerias (Despierre, 71).

Otro inconveniente de utilizar el telurito potásico en los medios de cultivo, es la dificultad que se plantea a la hora de diferenciar las colonias de listerias de las de otros gérmenes telurito reductores, que contaminen las placas de aislamiento (Mellado, 206).

En los ensayos que hemos realizado en 54 cepas de - las 4 especies de listerias con esta sustancia, obtuvimos crecimientos positivos a 22°C en todas las estirpes probadas, in

Cluso al doble de la concentración recomendada por Gray, si bien es cierto que al 0,1% se producen en algunas cepas fenómenos de disociación. Estos fenómenos también aparecen en medios sin inhibidores aunque en mucha menos proporción (124).- Nuestros resultados por tanto, concuerdan con los obtenidos por Wilkinson y col., (323b) que consiguieron el 100% de crecimientos cuando utilizaron el 0,05% de telurito potásico.

No obstante conviene precisar, que son necesarios - tiempos de incubación más largos (hasta 72 horas) para algunas cepas, cuando se emplea la concentración del 0,1%. A la concentración recomendada por Gray (124) el crecimiento que hemos observado es perfecto, aún a pesar de la incorporación de - - otras sustancias inhibidoras como el ácido nalidíxico. Si bien es cierto que en muestras muy contaminadas, sobre todo en coprocultivos, es muy difícil la selección de colonias de listerias al aparecer las placas muy contaminadas. Con un poco de práctica se pueden solucionar parte de los inconvenientes que plantea la utilización de esta sustancia, pudiendo reservarse como inhibidor alternativo para muestras no muy contaminadas. Prueba de ello es que todavía se sigue utilizando en muchos - laboratorios (204), preferentemente asociado al ácido nalidíxico, que potencia su espectro de inhibición.

La polimixina B fue utilizada por primera vez en los medios para listerias por Bojsen - Møller en 1.963 (32). Este antibiótico afecta al crecimiento de gran cantidad de bacterias gramnegativas a concentraciones de solamente 7 u 8 UI/ml (318), si bien tiene el inconveniente de afectar mínimamente/ a las bacterias grampositivas.

A pesar de que las listerias soportan elevadas concentraciones de polimixina B, sobre todo en presencia de glucosa, aunque también la adición de otros carbohidratos incrementa espectacularmente la concentración mínima inhibitoria -

y, aunque se ha asociado a otros antibióticos y sustancias antibacterianas, lo cierto es que nunca ha rendido excesivos resultados, y su efecto inhibidor sobre la flora gramnegativa, puede ser sustituido con ventaja, por la adición de otras sustancias.

No obstante, y cuando la flora bacteriana contaminante resulta sensible a la acción de este antibiótico y debido a su baja toxicidad para las listerias, se puede utilizar bien sola (71) o bien para complementar la acción sobre algunas bacterias gramnegativas como las pseudomonas, que otras sustancias consideradas más eficaces (ácido nalidíxico, por ejemplo) no son capaces de inhibir (103). Así, Despierres en 1.971 (71) describe unos medios asociándola al ácido nalidíxico, azul de metileno y a la ramnosa, con resultados variables que serán discutidos al comentar estos medios.

En cualquier caso, las dosis de utilización recomendadas por los diversos autores (32, 71) están muy por debajo de las CMI obtenidas en nuestro ensayo para las distintas cepas de listerias.

El ácido nalidíxico, incorporado por primera vez en 1.966 por Beeres y Tahon-Castel, tiene un gran poder inhibidor de la flora gramnegativa, enterobacteriacea en particular. A partir de esa fecha ha sido la sustancia incorporada más frecuentemente a los medios selectivos, bien sola o bien asociada con otros compuestos. Prueba de ello son las excelentes referencias de las primeras figuras en la investigación de listerias Kampelmacher y col., (171), Seeliger y col., (280), Ralovich y col., (248), Khan y col., (180), Elischerova y col., (86) y Ortel (226).

La explicación de tan excelentes referencias vienen avaladas por las propiedades biológicas de este producto, que a las dosis recomendadas de 40 mg/l y con pH próximos a la --

neutralidad, no entorpece en absoluto el crecimiento de ninguna estirpe de las cuatro especies del género (103), ejerciendo en cambio un severo control sobre la flora gramnegativa aunque permite el crecimiento de algunos géneros tales como Pseudomonas, Streptococcus, Staphilococcus y Erysipelothrix (71). Por ello, se ha intentado complementar con otras sustancias que inhibieran esta flora, no siempre con buenos resultados. Así, se le ha asociado con polimixina B y azul de metileno (71), tripaflavina (249), acetato de talio (186), telurito potásico (180), tiocianato potásico (81), etc.

Hoy día, existen trabajos que proponen sustituir el ácido nalidíxico por un producto de características muy similares, el ácido oxólico, y que al parecer, además de inhibir la flora gramnegativa (inhibida por el ácido nalidíxico), es capaz de impedir el crecimiento de Pseudomonas y Erysipelothrix, no afectando en cambio, al de las Listerias (103).

Nosotros hemos ensayado el crecimiento de 56 cepas de listerias de las 4 especies, no observando ningún tipo de inhibición, de acuerdo con Wilkinson y col., (323b), ni incluso a dosis de 50 mg/l cuando además, se les añade 80 mg/l de Tripán azul.

Los medios de cultivo que sólo contienen ácido nalidíxico como sustancia inhibidora, adolecen de una selectividad estricta. A pesar de ello pensamos que es la sustancia más recomendada cuando se trata de muestras poco contaminadas o cuando se complementa con otras sustancias (186, 71, 89).

Un detalle que conviene tener en cuenta es que el ácido nalidíxico se muestra mucho más activo en pH ácidos, por tanto deberemos considerar esta circunstancia cuando los medios en que se utilice puedan sufrir acidificaciones.

No disponemos de ninguna referencia en lo que respecta a la utilización del tripán azul como sustancia inhibidora en los medios de cultivo para listerias (159b). No podemos ofrecer, por tanto, datos comparativos, únicamente señalar que utilizamos esta sustancia tripanocida por permitir un perfecto crecimiento de los microorganismos del género Listeria (incluso concentraciones de 80 a 100 mg/l) potenciando el espectro de inhibición del ácido nalidíxico.

Además de sus características antimicrobianas, el tripán azul ha funcionado como un buen indicador del crecimiento en los distintos medios en los que se empleó, puesto que los microorganismos al crecer, deben metabolizar el tripán para producir el viraje de esta sustancia hacia el amarillo.

La observación hecha de que algunos derivados acrílicos, inhiben gran cantidad de microorganismos grampositivos y que, sin embargo, no entorpecen el crecimiento de L. monocytogenes, permitió a Ralovich y col., (249) la confección de un medio selectivo a base de ácido nalidíxico para inhibir la flora gramnegativa y tripaflavina para la grampositiva.

La acriflavina tiene la gran ventaja de inhibir el crecimiento de los estreptococos; ahora bien, a las concentraciones normalmente utilizadas (50 mg/l) según la recomendación de Ralovich y col., (249), la tripaflavina inhibe el crecimiento de las especies L. grayi y L. murrayi y ralentiza el de algunas cepas de L. monocytogenes y L. denitrificans. Por tanto, si bien los medios con tripaflavina y ácido nalidíxico son extraordinariamente útiles para aislar L. monocytogenes y L. denitrificans de muestras muy contaminadas (sobre todo coprocultivos), ya que se complementan muy bien en el espectro de inhibición, debemos tener la precaución de utili-

zar paralelamente, algún medio que permita el aislamiento de L. grayi y L. murrayi cuando sea necesario su aislamiento.

La utilización de la tripaflavina a dosis más bajas (de 10 a 18 mg/l), como hemos hecho en nuestro estudio, acompañada de otras medidas selectivas, permite aislar la mayor parte de cepas de las especies L. grayi y L. murrayi. Es esta concentración nos permitió el crecimiento del 94,4% de las cepas ensayadas de estas especies, obteniendo a pesar de la baja concentración empleada, cultivos bastante puros y en los que las colonias de listerias se distinguen perfectamente de las bacterias contaminantes, que suelen ser con frecuencia microorganismos de la familia Pseudomonadaceae.

El porcentaje de cepas resistentes de las especies L. grayi y L. murrayi puede no ser completamente real, dado que gran parte de nuestras cepas están aisladas de medios de cultivo que contenían estas concentraciones de acriflavina; aunque debemos mencionar que la acriflavina que hemos utilizado, de la casa Serva, es en realidad una mezcla de tripaflavina (cloruro de 3.6 diamino - 10 - metilacridinio) y su precursor, la proflavina (3.6 - diamino - acridina).

De lo que no debe quedar duda no obstante, es que una parte importante de las estirpes de L. grayi y L. murrayi pueden ser aisladas en medios que contengan de 10 a 18 mg/l de esta acriflavina, (Serva).

La incorporación de azida sódica como sustancia selectiva en los medios de cultivo y en concentraciones del 0,01%, según propuso Gray en 1.950 (124), ha permitido el crecimiento de todas las cepas, tanto las procedentes de colección como las aisladas a partir de los coprocultivos.

Esta concentración por tanto, ha permitido el crecimiento de todas las especies del género en contra de lo indicado por Wilkinson y col. (323b) en una experiencia reali-



zada en 1.977 en la que obtuvieron crecimientos sólo en un - 16% de las cepas de L. monocytogenes hemolíticas ensayadas.

Concentraciones del 0,025%, suponen un menoscabo - en el crecimiento de las distintas cepas, aunque , sigue existiendo un crecimiento visible de todas las especies del/ género. Paradójicamente, Wilkinson y col., (323b), a la misma concentración, sólo lo obtienen en el 8% de las cepas hemolíticas de L. monocytogenes, proporción que aumenta hasta/ el 33% cuando se trata de cepas no hemolíticas y al 100% - - cuando se trata de cepas de las especies L. grayi y L. murrayi.

Aumentando la concentración de azida de sodio al - 0,05%, desaparece el crecimiento visible en todas las cepas, haciéndose necesario el empleo de lentes de 20 a 40 aumentos para visualizar el crecimiento. Mediante este sistema óptico se constata el crecimiento de todas las cepas excepto - una de la especie L. grayi, en contra de los resultados que/ obtenían Wilkinson y col., para los que las especies L. grayi y L. murrayi fueron las más resistentes a este agente.

Concentraciones de 0,1% suponen la desaparición total del crecimiento, no siendo posible (ni aún con lupa) visualizar ningún tipo de colonias en las distintas especies.

Las fuertes discrepancias de nuestros resultados - con los obtenidos por Wilkinson y col., (233b), podrían basarse en que estos autores no comentan en su trabajo cuando/ consideran un crecimiento negativo por parte de las listerias, si cuando desaparecen las colonias visibles aún cuando existan colonias microscópicas como un signo de crecimiento.

El desacuerdo también podría deberse a que utilizamos en nuestra experiencia, la azida sódica junto al trifeniltetrazolio a concentraciones del 0,01%. A esta concentración y de acuerdo con Wilkinson y col., (323b), se produce -

siempre la reducción de este indicador por parte de las listerias. El color rojo que adquieren las colonias al reducirlo, nos permitió una visualización más rápida y eficaz de -- los crecimientos.

No tenemos referencias de ningún otro ensayo sobre la capacidad de crecimiento de los microorganismos del género Listeria, cuando al medio de cultivo se le añade azida de sodio. Ni el mismo Gray, que fue quien propuso la adición de esta sustancia (124), lo comenta en su monografía de 1.966 - (133).

Podemos por tanto, a la vista de nuestros resultados afirmar que concentraciones de 0,01% de azida de sodio - permiten el crecimiento de todas las cepas de listerias ensayadas, y quizás sería útil la adición a los medios de aislamiento de esta sustancia (con gran poder inhibidor sobre la flora gramnegativa), como propuso Gray en 1.950 (124).

Por último, debemos tener en cuenta una circunstancia que puede tener cierta trascendencia en el análisis rutinario de aguas y alimentos, y es que la mayoría de los medios para aislar e identificar enterococos se basan en:

- 1.- La acción selectiva del azida sódica en concentraciones entre el 0,02 y el 0,04% (44b, 51, 66).
- 2.- La temperatura de cultivo.
- 3.- La reducción del trifenil tetrazolio (44b, 141)
- 4.- El aspecto morfológico de colonias y microorganismos.
- 5.- La acidificación de la glucosa sin producción/ de gas.

Como quiera que algunas cepas de listerias son capaces de crecer en estas concentraciones de azida sódica, multiplicarse a temperaturas de 45°C (323b), reducir el trifenil tetrazolio (66), acidificar la glucosa sin producción de gas/

(284), y no es raro que debido al gran pleomorfismo de las listerias puedan aparecer con forma cocácea (133) (sobre todo al crecer en condiciones disgenésicas), pudiera suceder/ por tanto, que dada la gran ubicuidad y resistencia de las listerias, se esté informando en ocasiones sobre contaminaciones por estreptococos fecales, cuando en realidad se trate de microorganismos del género listeria, con el error diagnóstico que ello implica.

La utilización de bilis de buey como sustancia selectiva en los medios de Listeria, fue sugerida por primera vez por Robin y col., en 1.960 (259), al parecer con buenos resultados.

Nosotros hemos confirmado una perfecta tolerancia/ de estos microorganismos a altas concentraciones de bilis -- (40%), por tanto, podría emplearse como agente inhibidor en los medios de cultivo.

Ahora bien, debido al espectro de inhibición de esta sustancia, que precisamente permite el crecimiento de los géneros que nos pueden ser más indeseables (Streptococcus, - Proteus, etc.) no se utiliza en la actualidad como agente inhibidor, ni aún en asociación con otras sustancias, quedando relegada esta prueba a una característica fisiológica más.

Se ha utilizado además, otro gran número de sustancias como agentes inhibidores: rodanato potásico (47), cloruro de litio (197) guanofuracina (287), distintos colorantes/ (232) y antibióticos (47, 133), incluso se ha elaborado un medio sintético mínimo para el aislamiento de listerias (38), que no pasamos a comentar por no contar con experiencia -- suficiente sobre su utilización.

### VI.3. DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS Y SUS RESULTADOS

El sistema de clasificación que hemos elegido, siempre restrictivo (56b, 37), plantea algunos inconvenientes. Estos derivan de utilizar, con un criterio selectivo, unas cuantas pruebas bioquímicas consideradas un poco subjetivamente como fundamentales. Con ello se corre el riesgo de que cepas variantes - de Listerias que por algún motivo determinado fallen en una de/ estas pruebas inmediatamente quedaría descartada.

Como nuestro propósito era llevar a cabo un estudio estadístico sobre el estado de portadores fecales, preferimos en/ todo momento descartar estas cepas sospechosas, cuya incidencia era mínima, para que los resultados tuvieran la máxima fiabilidad posible.

Ahora bien, esto no fué realidad en toda su extensión, pues algunas cepas que morfológicamente se mostraban como microorganismos del género, pero bioquímicamente ofrecían resultados dudosos (por escasez de crecimiento en los sustratos de estas - pruebas), fueron ensayadas una y otra vez sobre distintos sustratos con el fin de comprobar si en realidad se las podría encuadrar dentro del género Listeria. De esta forma llegamos a - modificar la composición de los medios habituales para la realización de estas pruebas y las condiciones de cultivo de alguno/ de estos medios, sustituyéndolos por otros que nos ofrecían resultados más fiables.

Así introdujimos las siguientes modificaciones:

Para las pruebas de Voges-Proskauer y Rojo de metilo, se utilizó el medio descrito por Buchanan y col. (141) para estreptococos lácticos de difícil crecimiento. Las temperaturas/ de incubación fueron de 22°C y el tiempo de una semana.

Hemos conseguido con esta técnica recuperar y dar como

positivas, muchas listerias que de otra manera hubieran sido -- descartadas.

Algo parecido sucedió con el medio base de utilización de azúcares, que confeccionamos según la composición descrita -- por Evans (94) para la fermentación del manitol por los estafilococos. Con este medio comprobamos no sólo que las listerias/ se multiplicaban fácilmente, sino también, y de acuerdo con -- Evans (94), que el indicador óptimo era el púrpura de bromocresol, utilizado en solución acuosa y a una concentración final -- de 0,002%. La temperatura de incubación fué también de 22°C. Se consiguió con estas modificaciones obviar algunos de los resultados contradictorios que veníamos obteniendo con azúcares -- en los que una misma cepa se mostraba unas veces positiva y -- otras negativa.

Para comprobar la movilidad y hacer su interpretación/ lo más objetiva posible, utilizamos un medio de cultivo semisólido y muy rico en sustancias nutritivas, con el objeto de obtener un perfecto crecimiento de todas las cepas. Este medio era distribuido en tubos de Craigie (51), e incubado a 22°C. Al -- efectuar la lectura interpretabamos como movilidad positiva la/ de aquellas cepas que eran capaces de salir del tubo interno.

En cuanto a la prueba de la reducción de nitratos, al/ intentar verificarla en las cepas sometidas a control, algunas/ de ellas no fueron capaces de crecer en el medio ordinario descrito por Harrigan y col. (141), haciéndose imposible su interpretación. Enriquecido el medio con extractos de carne y levadura, y tras comprobar su funcionamiento con varias cepas patrón/ positivas y negativas a la reducción, ensayamos todas nuestras/ cepas con óptimos resultados.

Una circunstancia que ya mencionamos en su momento -- (302) y que repasando la bibliografía hemos encontrado descrita por otros autores en trabajos no publicados (166, 105), es la --

depresión de la actividad de la catalasa, e incluso su desaparición cuando se añaden al medio algunas sustancias como glucosa/ al 1%, o extracto de levadura al 0,25%.

A pesar de las contradicciones y la falta de suficiente explicación de este fenómeno en las referencias que tenemos, procuramos que estas sustancias no estuvieran presentes en los/ medios a partir de los cuales tomábamos las colonias para realizar la catalasa.

Otro detalle digno de tenerse en cuenta, es que al intentar demostrar en las distintas cepas la hidrólisis en placa/ de almidón, incluso tras 15 días de incubación, no fuimos capaces de verificar en las estirpes probadas ningún tipo de actividad amilásica (ni alfa, ni beta). Sin embargo, paradójicamente observamos en un porcentaje muy alto de las cepas, (más de un - 79%) la acidificación en tubo de esta sustancia en los medios - de utilización de azúcares.

Como puede observarse en las tablas B-1, B-2 y B-3, -- los resultados de las distintas pruebas bioquímicas son bastante uniformes. Ello puede ser debido al sistema de clasificación elegido y al haber sido bastante reacios a admitir cepas - que no encuadraran en las pruebas de clasificación básicas. A/ pesar de ello, se admitieron como listerias algunas cepas que - fallaron en alguna de estas pruebas, pero que mostraron en conjunto una gran coherencia en su comportamiento.

Así, se admitieron como L. monocytogenes una cepa inmóvil, dos Voges-Proskauer negativas y dos rojo de metilo dudosas. No se clasificó sin embargo, ninguna cepa que fermentara el manitol, ni como L. monocytogenes, ni como L. denitrificans.

Los porcentajes de resultados positivos para las distintas pruebas, coinciden casi perfectamente con los obtenidos/ por Kampelmacher y col. (175), Gómez-Mampaso y col. (116), - -

Cooper y col. (53) y Seeliger y col. (284). Sin embargo, encontramos una diferencia en la acción sobre el almidón: así, mientras a Gómez-Mampaso le resultaron todas las cepas negativas, - nuestros resultados dependían de la técnica empleada, obteniendo un 100% de resultados negativos cuando intentábamos apreciar la hidrólisis en placa, y un 70,6% de resultados positivos cuando lo que se intentaba observar era la acidificación en tubo, - quedando este fenómeno sin explicación clara como hemos comentado anteriormente, aunque sospechamos que puede ser un problema/ de sensibilidad para detectar ciertas amilasas y dextrinasas.

#### VI.4. DE LOS ESTUDIOS HEMOLITICOS

La adopción de la técnica de hemólisis en tubo, así como los resultados que obtuvimos, merecen la pena ser comentados debido a la gran trascendencia que pueden tener a la hora de encuadrar las diversas cepas en una determinada especie (Rocourt/ y col., 261), así como para verificar su posible patogenicidad (See liger y col., 283).

Los resultados que veníamos observando, de cuando menos apreciar una cierta capacidad hemolítica en todas las cepas del género cuando el medio de cultivo contenía glucosa, han sido -- también observados por Nicheva y col., (215); aunque ellos sólo lo han apreciado en cepas de L. innocua.

Con posterioridad y al emplear la técnica de hemólisis en tubo, se observó claramente que cuando el medio sobre el que se suspendían los gérmenes contenía al menos un 0,5% de glucosa, todas las cepas de microorganismos del género Listeria producían hemólisis total de los hematíes de carnero, en un plazo/ de menos de 8 horas. Esta hemólisis se inhibía (en las cepas -- que no eran hemolíticas cuando al medio le faltaba glucosa), -- cuando al medio se le añadía tampón fosfato, y se inhibía tam-- bién o se producía una débil reacción, cuando la suspensión bac-- teriana permanecía en el medio con glucosa durante 8 horas, po-- niéndola a continuación en contacto con los hematíes. Estas in-- hibiciones no se verificaban en las "verdaderas" cepas hemolíti-- cas.

Diluciones al 1/10 de la suspensión en glucosa inhibía la reacción, pero no una neutralización del medio, cuando ésta se hacía con sosa.

Todo lo anteriormente expuesto, podría permitirnos pre-- suponer que es un metabolito de la glucosa el que produce la he



hémolisis de los hematíes de carnero. Este metabolito debe ser intermedio, ya que con posterioridad desaparece por lo menos parcialmente, y se inactiva parcial o totalmente con fosfato disódico. La acción hemolítica no obedece simplemente a la acidificación del medio por la utilización de la glucosa, puesto que la neutralización con sosa no inhibía la hemólisis. Por otra parte, la misma prueba realizada en otro género de bacterias -- (E. coli) que no era hemolítica sobre un medio sin glucosa, nos producía el mismo fenómeno.

Cuando las pruebas se realizaron en medios totalmente exentos de glucosa, el resultado de las mismas fue más o menos el esperado, mostrándose hemolíticas sólo algunas cepas de L. monocytogenes.

Sin embargo, los porcentajes de cepas hemolíticas hallados, presentan fuertes discrepancias con los obtenidos en coprocultivos humanos por otros autores: así, nos encontramos con que mientras nosotros obtenemos de un 12 a un 13% de cepas hemolíticas, Gómez-Mampaso y col. (114) encuentran un 6,2% en las cepas de origen fecal y un 100% en las cepas de origen vaginal, si bien hay que considerar que más del 60% de esta estirpe procedían de puerperas con niños muertos e incluso muchos de ellos con un diagnóstico positivo de listeriosis en cuyo caso parece evidente, que al tratarse de listerias patógenas deberían presentar mayor poder hemolítico (284).

Kampelmacher en Holanda (172, 174) encuentra porcentajes de cepas hemolíticas que oscilan entre el 0 y el 10% dependiendo del origen de las muestras. Los valores entre el 20 y el 50% son los más habituales para cepas de origen fecal, tanto humano como animal.

Otro dato que no nos consta, es la técnica utilizada por estos autores para evidenciar la hemólisis, y si los medios

empleados contenían glucosa, pues como ya ha quedado reseñado - en el capítulo de resultados, cuando esta sustancia se encuentra incorporada en los medios de observación de la hemólisis, - nosotros hemos encontrado el 100% de cepas positivas.

Por otra parte, si consideramos las cepas que hemos -- mencionado como dudosas, que son aquellas en las que la hemólisis producida era solamente parcial, (encontrábamos diferencias con el testigo, pero no se observaba hemólisis completa) que su madas a las cepas consideradas como hemolíticas representan un/ 29% de cepas hemolíticas, porcentaje muy parecido al encontrado por Kampelmacher (172) para cepas aisladas de heces de personas o animales sanos.

A pesar de estos resultados, no parece que estas diferencias sean debidas a deficiencias en la técnica de hemólisis/ en tubo, ya que en los casos que se contrastó incluso con la -- técnica de CAMP (que parece ser la más fiable, 284), funcionó - perfectamente, al menos con iguales resultados, siendo sin - - embargo, una técnica mucho más rápida (se puede visualizar los/ resultados en menos de 24 horas), fácilmente observable y de -- más fácil interpretación al existir la posibilidad de comparar/ los resultados con tubos testigos, no apareciendo los fenómenos de digestión y hemopectolisis, que pueden presentarse en las -- placas debido al crecimiento bacteriano y que dificultan la lec tura de los resultados.

Esta técnica además supone una gran economía de tiempo, medios y material (10 ml de sangre sirven para realizar unas -- 200 pruebas), es fácilmente reproducible e incluso cuantifica- ble fotolorimétricamente.

Se ha obtenido una gran uniformidad en las respuestas/ hemolíticas de las distintas cepas independientemente de la es pecie animal de la que se aislaron, dato que nos parece de la ma

yor importancia, para una posible aunque discutible valoración, de la patogenicidad de las cepas de listeria presentes en el intestino.

Por otra parte y como hemos encontrado una cierta relación entre poder hemolítico y patogenicidad entre las distintas cepas y, a pesar de que esta relación no ha sido biunívoca, parecería evidente que el porcentaje de L. monocytogenes no hemolíticas fuera mayor en poblaciones de cepas aisladas de portadores sanos (en los que las bacterias aisladas tienen un bajo nivel de virulencia, Khan y col., 182) que en poblaciones aisladas de casos patológicos en que las cepas tienden a tener una mayor tasa de virulencia y por tanto serán hemolíticas con mayor frecuencia, aunque como queda ampliamente expuesto en una extensa bibliografía (Gray y col., 133, Cormier, 55, Wilkinson y col., 323b), sea esta una característica que se pueda perder en determinados casos.

#### VI.5. DE LAS TECNICAS Y RESULTADOS SEROLOGICOS

A la hora de elegir una prueba con el fin de controlar de alguna manera el suero de los animales muestreados, fuimos - conscientes de la poca fiabilidad de estas técnicas para llegar a establecer un diagnóstico concreto y fiable de listeriosis, / como queda reflejado en la amplia bibliografía (Seeliger y col. 289, Gray y col. 133, Wilkinson y col. 323, Romaña 265, Morel y col. 213, etc.). Por este motivo y, dado que ninguna prueba -- era concluyente, elegimos la seroaglutinación con antígenos somáticos en tubo, porque fué la que más fácilmente pudimos montar por su simplicidad y por disponer de los antígenos comerciales.

Los resultados obtenidos se pueden extrapolar perfectamente a los encontrados en otros países, tanto en personas como en animales.

A pesar de que los resultados encontrados estaban dentro de los valores esperados, merece la pena comentar una serie de circunstancias que no por esperadas son menos importantes.

En primer lugar, la fuerte correlación negativa encontrada entre edad y título, correlación que a primera vista parece muy evidente ya que a mayor edad de los animales es de esperar que exista un título mayor, pero que de esta manera queda - estadísticamente demostrada.

Esta correlación es mucho mayor en el ganado bovino -- que en el ovino, quizá por tratarse de lotes más homogéneos en / lo que a la edad se refiere.

Por otra parte, al comparar la media de las dos poblaciones (ovina y bovina) nos hemos encontrado con que existe una diferencia significativa en lo que se refiere a la tasa de aglutininas séricas de ambas especies frente a L. monocytogenes, por tanto podríamos aplicar las mismas consideraciones que se ha --

rán al comparar los resultados de los antibiogramas de las cepas de L. monocytogenes obtenidas en las 2 especies:

Al partir de lotes de animales que aún en el caso extremo que los consideráramos con una respuesta sérica uniforme/frente al contacto con microorganismos del género Listeria, se hallan en unas circunstancias ambientales tan distintas y con unos grados de exposición tan variables que no es raro que nos encontremos estas diferencias. A pesar de ello, descubrimos -- una mayor uniformidad en las respuestas de los animales de una edad equivalente pero de una especie distinta, que en los de la misma especie pero edades distintas (figuras S-4 y S-5).

Otro detalle digno de resaltar y que no es frecuente en la bibliografía, es que no encontramos ni un sólo animal de la especie bovina con título negativo a pesar de que el 55% de los animales encuestados eran menores de 18 meses. En el ganado ovino, sin embargo, nos aparecieron hasta 21 animales con título negativo, 16 de los cuales son corderos pascuales.

Muchos autores recomiendan como más fiables otros tipos de reacciones serológicas que ellos consideran más específicas, así Romaña (265) recomienda la inmunofluorescencia indirecta al igual que Pautard y col. (236), Rigal y col. (256), la electrosinéresis; Clavel y col. (50), la seroaglutinación pero empleando antígenos H que parecen ser más específicos que los somáticos, y en este sentido Stanek y col. (299) describen un caso con un título de aglutininas antíflagelares de hasta 1/32.000, mientras que paradójicamente no se detectaban anticuerpos somáticos.

A pesar de todas estas consideraciones y que realmente parece ser que mediante la inmunofluorescencia indirecta o el E.L.I.S.A se obtienen títulos séricos un poco más altos (Roussel-Delvallez y col., 267) y que los antígenos somáticos prepa

rados a base de L. monocytogenes tienen un cierto poder autoaglutinante (Seeliger, 284), la mayoría de los autores consideran - la seroaglutinación en tubo como técnica de referencia (Morel y col. 213, Elischerova y col. 86, Rigal y col. 256, entre otros), obviando este último problema mediante el empleo de un número - adecuado de testigos tanto del antígeno como del suero (Wilkinson y col. 323).

En cuanto al valor diagnóstico de los títulos encontrados, y a pesar de ser tan elevados, no nos permiten extrapolar conclusiones ni sobre el grado de contaminación de los rebaños, ni siquiera sobre su grado de exposición; pues, como ha quedado señalado, se han encontrado habitualmente los mismos títulos, que a su vez eran elevados, tanto en personas y animales fuertemente expuestos a contaminación, como en personas o animales relativamente aislados sin fuentes aparentes de contagio -- (Elischerova y col. 86, Kampelmacher y col. 172, Bojsen-Møller y col. 33).

#### VI.6. DE LA METODOLOGIA Y RESULTADOS DE LOS ANTIBIOGRAMAS

La elección de la técnica de difusión en Agar en lugar de cualquiera de las técnicas de dilución en medio sólido o líquido (Ericson y col., 91), pensamos que queda suficientemente justificada por el motivo de ser la técnica más ampliamente difundida en todos los laboratorios clínicos del mundo (66), permitiendo una facilidad, versatilidad y economía de trabajo y medios, que no se consiguen con las otras técnicas.

Además, una vez que los medios y la técnica están perfectamente normalizados, mediante la aplicación de los resultados obtenidos a las rectas de regresión, que cualquier laboratorio suministra para sus discos, se puede calcular fácilmente -- las concentraciones mínimas inhibitorias, que serán extrapolables con las obtenidas en cualquier otro laboratorio cuando se haya empleado la misma técnica (66).

Por otra parte, la clasificación que hemos establecido de las cepas de listerias en sensibles, intermedias y resistentes, según su respuesta a los distintos antibióticos, así como/ el criterio para encuadrarlas en estos grupos, está de acuerdo/ con el criterio seguido por la O.M.S. (66, 91) con el fin de suministrar al clínico, no sólo el resultado de la concentración/ mínima de un antibiótico que es capaz de inhibir a una bacteria, sino también la interpretación de este resultado según la utilidad que pueda tener un determinado antibiótico en el tratamiento de un problema infeccioso concreto.

En cuanto a los resultados sobre la respuesta de las - 93 cepas de L. monocytogenes probadas frente a los 10 antibióticos, y a la vista de los resultados expresados en la tabla AB-8 en la que comparamos estadísticamente las medias de los halos y las CMI obtenidas en los 2 tipos de cepas utilizados (origen -

bovine y ovino) nos encontramos con que existe una discordancia en la respuesta a los distintos antibióticos por parte de las dos poblaciones, y por tanto con bastante probabilidad existirá una diferencia significativa, entre los dos subconjuntos de cepas.

Situación, por otra parte, que tampoco debe sorprendernos demasiado, pues si recordamos los sistemas de explotación - en nuestro país de una y otra especie, nos encontramos con que/ en ganado vacuno tanto la obtención y cebo de terneros y añejos, como las explotaciones lácteas, suelen ser sistemas de producción intensivos, mientras que las explotaciones ovinas tanto de carne como de leche suelen ser de régimen extensivo, con la diferencia que ello implica, en el suministro junto con el pienso, de finalizadores, antibióticos y quimioterápicos, a lo largo de la vida productiva de los animales y, sobre todo, en la etapa terminal o a la utilización solamente terapéutica de los distintos antibióticos.

Y aunque es un hecho probado, la débil intervención de los antibióticos en la aparición de resistencias a los mismos - (66), está suficientemente demostrada la labor que ejercen al suministrarlos en la dieta del animal, en la selección de cepas mutantes resistentes y supervivientes (66), factor que podría explicarnos las distintas sensibilidades que hemos encontrado en las dos especies a los antibióticos "habituales" y la menor aparición de cepas resistentes en el ganado ovino.

Otro hecho que merece la pena tenerse en cuenta a la vista de los resultados expresados en las tablas AB-1, AB-2, -- AB-3, AB-4, AB-5 y AB-6, es que sólo un antibiótico de los ensayados (Rifampicina) se mostró eficaz para todas las cepas, con el inconveniente sin embargo, de ser un antibiótico que difunde mal en el sistema nervioso y que por tanto, no nos servirá -



para tratar la mayoría de las infecciones meníngeas y meningoencefálicas causadas por las listerias, imponiéndose por tanto la necesidad de realizar rápidamente un antibiograma para comenzar el tratamiento en estos casos.

Para el tratamiento de las posibles listeriosis que pudieran causar estas cepas y que afectaran a cualquier otro órgano de la economía animal, un tratamiento sinérgico de penicilina-estreptomicina por vía parenteral a dosis habituales resolverá el 100% de los problemas, haciéndose necesario únicamente el tratamiento tópico directo con los mismos antibióticos en los casos de metritis y vaginitis.

Si comparáramos los resultados de la antibiorresistencia obtenida por nosotros en cepas de origen fecal con la encontrada por otros autores en cepas de origen clínico, aparecen ciertos detalles que merecen la pena de ser comentados.

En primer lugar, la gran sensibilidad de las cepas de L. monocytogenes a los antibióticos betalactámicos (57, 116, -- 268) con valores de CMI muy parecidos a los hallados por nosotros. Sensibilidad que, incluso, alcanza al 100% de las cepas/ para algunas penicilinas como la bencil penicilina y algunas -- ampicilinas como amoxicilina (60).

En cuanto a la respuesta frente a los demás antibióticos, los resultados son variables dependiendo del autor y país/ considerado; así, mientras podemos extrapolar perfectamente -- nuestros resultados con los obtenidos por Gómez-Mampaso y col./ (57) en Madrid, entre los años 1.972 y 1.975, en 141 cepas de -- origen humano de las que el 70% eran de origen fecal y el otro/ 30% era de origen clínico, encontramos ligeras diferencias con/ los resultados obtenidos por Sale (268) y Espaze (93) en Inglaterra y Francia respectivamente.

Asimismo, descubrimos ligeras diferencias con la sen-

sibilidad hallada por Cromberg y col. (60) en Suiza, en cepas - de origen clínico, sobre todo en lo que hace referencia a la re sistencia a la tetraciclina y eritromicina, que para ellos resul- tan siempre eficaces. Por último, debemos mencionar la gran -- utilidad y eficacia del trimetoprim, muy activo a concentracio- nes de 0,03 a 0,06 mg/l (60) y que en combinación con el sulfa- metazol es bactericida para un 96% de las cepas ensayadas por - Winslow y col. en USA (325), perdiendo según este mismo - - - autor, su poder bactericida al suministrarlo junto con doxici-- clina, ampicilina y rifampicina. Para Sale y col. (268) en - - Inglaterra las CMI, sin embargo, eran bastante más altas (unas/ 100 veces). Además no solamente no constataron efectos antagó- nicos con las tetraciclinas y la ampicilina, sino que descubrie- ron que aparecían efectos sinérgicos.

Por último debemos mencionar que, aunque no se han de- tectado todavía en listerias plasmidos responsables de su resis tencia a los antibióticos (240), sí se ha observado, por estos/ mismos autores, la transferencia de plasmidos de otros géneros/ a diversas especies del género Listeria, transferencia que, si/ bien, se realiza a muy baja frecuencia, podría plantear algún - tipo de problemas en un futuro próximo, por disminución de la - susceptibilidad de las listerias a los agentes antimicrobianos.

#### VI.7. DE LAS INOCULACIONES EXPERIMENTALES

Los resultados de las inoculaciones experimentales, como era de esperar, dependen además de la cepa inoculada, de la especie animal y de la vía elegida para ello.

Todas las cepas de L. monocytogenes inoculadas por vía subdural y de acuerdo con los trabajos de Gray y col. (133) produjeron un cuadro meningoencefálico con generalización sobreaguda de la enfermedad a todo el organismo, siendo necesaria la inoculación endovenosa simultánea de un antibiótico que no se difunda al cerebro para impedir esta generalización y conseguir la producción del cuadro meningoencefálico puro (Gray y col., - 126).

Por otra parte y coincidiendo con los resultados obtenidos por Patocka y col. (235), se ha observado que la inoculación por vía subdural de cepas de L. monocytogenes no hemolíticas (consideradas tradicionalmente como no patógenas, Seeliger, 284) han originado el cuadro meningoencefálico con sistematización de la enfermedad en breve espacio de tiempo, aún en animales considerados en cierta forma como refractarios a padecerla, como pueden ser los cobayas (124). Debe reconsiderarse a nuestro entender y como recomiendan otros autores (235, 202, 281, -- 90), la no patogenidad de las cepas no hemolíticas de L. monocytogenes.

Cuando la vía elegida para la inoculación fué la oral, la reproducción de la enfermedad fué muy difícil, consiguiéndose únicamente en casos muy esporádicos, coincidiendo con los trabajos de Gray y col. (133). No obstante ha habido autores -- que lo han conseguido con cierta regularidad empleando animales libres de gérmenes obtenidos gnotobioticamente (63, 327).

En los casos de las inoculaciones intramusculares, intraperitoneales, endovenosas y subcutáneas, los resultados ofre

cen bastante uniformidad, apareciendo los ratones como los animales más sensibles y las cepas hemolíticas como las más patógenas, coincidiendo con los resultados de Emody y col. (90).

Las inoculaciones intraoculares y las instilaciones -- conjuntivales, también en coincidencia con la mayoría de los autores, no nos han producido generalizaciones en los casos de -- las cepas no hemolíticas, presentándose generalizaciones solamente en 7 casos y siempre al utilizar cepas hemolíticas; no obstante, las queratoconjuntivitis y las uveitis son las lesiones dominantes en los casos de las inoculaciones intraoculares, tanto con las cepas hemolíticas como las no hemolíticas (2).

La coincidencia con los diversos autores en los estudios anatomopatológicos realizados en los distintos órganos, -- así como en los aislamientos practicados a partir de ellos, es/ también total. El hígado es el órgano que más comunmente nos encontramos lesionado y del que habitualmente se aíslan más ligterias, presentando las lesiones el aspecto de microabscesos -- (Grangeponet y col., 121) y no apareciendo ninguna diferencia -- entre el tipo de lesiones causadas por L. monocytogenes hemolíticas y no hemolíticas, sino simplemente en la frecuencia de su aparición, de acuerdo con los trabajos de Emody (90) y Audurier (14).

Por tanto, se puede afirmar, como además queda demostrado estadísticamente en el capítulo de resultados, que la división de los microorganismos pertenecientes a la especie L. monocytogenes en patógenos y no patógenos es ciertamente aventurada (202, 281), siendo mucho más lógico referirse a cepas de mayor o menor virulencia, y animales más o menos receptibles, estando condicionados ambos factores por la vía de inoculación.

A la vista de los resultados expresados en la tabla -- I-15 el sistema de inoculación intraperitoneal en el ratón podría servirnos como método para diferenciar las cepas pertene--

cientes a la especie L. monocytogenes de las otras especies, -- pues a las dosis utilizadas de  $1,5 \cdot 10^8$  bacterias por mililitro, todas las L. monocytogenes (confirmadas bioquímicamente) resultaron mortales para el ratón al inocularlas intraperitonealmente, mientras que con estas mismas dosis y vía, ninguna cepa de las especies L. grayi, L. murrayi y L. denitrificans, resultó mortal para el ratón.

No es aconsejable sin embargo, la utilización de esta prueba como carácter único de diferenciación, pues si bien en nuestro trabajo no hemos encontrado ninguna cepa de estas especies que fuera patógena para el ratón, en la bibliografía (43) aparecen casos de cepas de L. denitrificans e incluso de alguna L. grayi que resultaron patógenas para el ratón a la dosis de  $5 \cdot 10^8$  bacterias.

## VII. CONCLUSIONES

### PRIMERA

Dada la gran labilidad de los microorganismos del género Listeria frente a un pH ácido, y su mayor aptitud para crecer a pH neutro o ligeramente alcalino, se ha comprobado que la estabilización mediante el tamponado de los distintos medios de cultivo (sobre todo cuando poseen en su composición azúcares -- utilizables), permite una mejor multiplicación y supervivencia/ de estos agentes.

### SEGUNDA

La utilización inicial, desde la toma de muestras en -- origen, de temperaturas de 4°C en los medios de recogida ha resultado extremadamente útil, por dos motivos fundamentales: -- a) a 4°C existen muy pocos microorganismos con capacidad de multiplicación y, en consecuencia, se proporciona al sistema unas/ posibilidades de enriquecimiento selectivo desde el primer momento, evitando indirectamente el agotamiento de los nutrientes del medio por efecto de la microflora contaminante, y b) a 4°C, cuando las condiciones son óptimas, las bacterias del género -- Listeria se conservan viables durante largo tiempo (años incluso), disponiendo así de un remanente de muestras que permitirá/ la confirmación de los resultados.

### TERCERA

La utilización de temperaturas de 22°C en el enriquecimiento y aislamiento respectivamente, supone grandes ventajas --

en la recuperación final de las listerias, en razón de que estos microorganismos se reproducen a esta temperatura con un tiempo de generación prácticamente igual que a 37°C, con la ventaja de que disminuye sensiblemente el crecimiento de la microflora contaminante, cuyo "habitat" natural sea el canal gastrointestinal de animales.

#### CUARTA

La incorporación de carbohidratos a los medios de cultivo para el enriquecimiento y aislamiento de listerias, supone una doble ventaja cuando estas bacterias están capacitadas para utilizarlos fácilmente. En primer lugar, existe la posibilidad de disponer de una fuente energética directa y en segundo término se estimula la formación de exopolímeros celulares o pseudocapsulas protectoras.

#### QUINTA

Se ha observado que la utilización en los medios de enriquecimiento, del método de "movilidad selectiva", permite el aislamiento de listerias en algunas muestras en las que el resto de los sistemas utilizables proporcionaban resultados negativos. Por otra parte, esta técnica proporciona a la vez un grado de objetividad superior al obtenido por otros procedimientos, en el estudio, propiamente dicho, de la movilidad de las diferentes estirpes.

#### SEXTA

La incorporación de sangre a los medios de aislamiento, supone (en razón de su opacidad) la modificación de la técnica de selección de colonias, utilizando la epiluminación o ilumi-

nación por reflexión con luz oblicua en sustitución de la clásica técnica de examen por transparencia o transiluminación. Esta opción no supuso inconveniente alguno en la labor de selección, resultando fácil la diferenciación de las colonias de listerias, cuando el medio de cultivo es el adecuado.

#### SEPTIMA

La utilización de esculina como único carbohidrato presente en el medio de aislamiento "C", potenció claramente el crecimiento de los microorganismos capaces de metabolizarla (todas las listerias gozan de esta capacidad), en detrimento de las bacterias que no pueden utilizarla como fuente de energía. Además, al incorporar este medio un indicador de la hidrólisis de este glucósido (citrato amónico-férrico) permite diferenciar macroscópicamente las colonias positivas a este carácter.

#### OCTAVA

La utilización de clorhidrato de acriflavina (Serva), en concentraciones superiores a 12 mg/l, inhibe el crecimiento de la mayor parte de las cepas de L. grayi y L. murrayi.

#### NOVENA

Comparando la eficacia del procedimiento clásico y la innovación propuesta para el cultivo y aislamiento de listerias, se observa: a) por una parte, el rendimiento 10 veces superior de nuestra técnica (116 cepas aisladas frente a 11, utilizando la técnica convencional), y b) la disminución significativa de los tiempos de cultivo, ya que se pueden conseguir aislamientos a partir de las 48 horas de la toma de muestras.

#### DECIMA



Conviene resaltar la eficacia de esta nueva metodolo--  
gía ensayada, gracias a la cual, en el estudio que se ha reali-  
zado en un rebaño de ganado ovino, se ha podido comprobar, que/  
el 88% de los animales muestreados resultaron portadores de mi-  
croorganismos del género Listeria; destacando las cifras de por-  
tadores encontrados para L. grayi (80%) y para L. monocytogenes  
(20%).

#### UNDECIMA

Concentraciones del 5% de ClNa en medio sólido, permi-  
ten el crecimiento de todas las cepas probadas, si bien se apre-  
cia una disminución del tamaño de las colonias. Concentracio--  
nes superiores de esta sustancia, se traducen en una clara dis-  
minución del crecimiento de algunas cepas.

#### DUODECIMA

Se pone claramente de manifiesto, la marcada resisten-  
cia de las listerias al telurito potásico. Todas las cepas pro-  
badas, soportan concentraciones del 0,1%.

#### DECIMOTERCERA

El ácido nalidíxico, se comporta como un extraordina--  
rio agente selectivo cuando se incorpora a los medios de cultivo  
para listerias. A concentraciones del 0,004% inhibe eficazmen-  
te la flora gramnegativa, aunque cuando el objetivo sea aislar/  
estos agentes de muestras muy contaminadas, convenga la utiliza-  
ción de algún otro sistema que complete la acción del ácido na-  
lidíxico.

#### DECIMOCUARTA

El tripán azul, se comporta también en medios para listerias, como un excelente agente selectivo. A la vez que permite en concentraciones del 0,008% el crecimiento de todas las --  
listerias probadas, complementa el espectro de inhibición del -  
ácido nalidíxico, y actúa como un indicador del crecimiento al/  
ser metabolizado.

#### DECIMOQUINTA

Todas las cepas ensayadas fueron capaces de crecer en/  
concentraciones del 0,025% de azida sódica. La práctica de es-  
ta determinación, conjuntamente con la de reducción del trife--  
niltetrazolio, supone, a la vez que una economía de tiempo, el/  
visualizar rápida y objetivamente las colonias presentes, inclu  
so cuando son microscópicas. En ningún caso ha podido ponerse/  
de manifiesto la presencia de interferencias entre ambos produc  
tos.

#### DECIMOSEXTA

Se pone de manifiesto la necesidad de utilizar medios/  
base complejos y no interferentes en cuanto se refiere a su con  
tenido nutritivo, cuando se pretende la realización de determi-  
naciones bioquímicas en microorganismos del género Listeria, --  
por cuanto que con medios mínimos, estos agentes presentan difi  
cultades para su crecimiento, que pueden originar resultados --  
falsamente negativos.

#### DECIMOSEPTIMA

Se considera de gran interés la mención de la técnica/ utilizada en la prueba metabólica del almidón por parte de los/ microorganismos del género Listeria, puesto que el resultado va ría enormemente según que el objeto de la investigación sea la/ simple hidrólisis o la producción de ácido a partir de este polisacárido.

#### DECIMOCTAVA

Todas las estirpes probadas de las 4 especies del género Listeria, producen un cierto efecto lítico sobre los hemati- - ctes de carnero, cuando la prueba se lleva a cabo en presencia/ de glucosa a una concentración del 0,5%.

#### DECIMONOVENA

La técnica de hemólisis en tubo, permite la realiza- - ción de una gran cantidad de determinaciones con gran economía/ de tiempo y medio, alcanzandose a la vez un grado de reproducti- - bilidad comparable al menos a la más sensible de las técnicas - descritas (CAMP-Test).

#### VIGESIMA

Las muestras procedentes de todos los animales objeto/ de estudio, presentaron una fuerte correlación entre el título/ de anticuerpos aglutinantes séricos y la edad de los animales - de procedencia. En el mismo sentido, se observa también una -- gran uniformidad en los títulos de los animales de edades equi- - valentes, aún cuando su especie fuera distinta.

#### VIGESIMOPRIMERA

La sensibilidad antibiótica de las cepas, presenta algunas discrepancias en razón de su origen. A pesar de ello, todas las cepas se han mostrado uniformemente sensibles a la rifampicina.

#### VIGESIMOSEGUNDA

Se destaca la gran uniformidad con que todas las cepas de L. monocytogenes, identificadas como tales bioquímicamente, se manifiestan patógenas para el ratón, puesto que todas ellas produjeron su muerte en un plazo máximo de 143 horas, inoculadas por vía intraperitoneal. Ninguna estirpe perteneciente a otra especie del género Listeria se mostró capaz de desarrollar una acción patógena por inoculación intraperitoneal. En consecuencia, esta prueba parece adicionalmente indicado para complementar la identificación bioquímica de la especie L. monocytogenes.

#### VIGESIMOTERCERA

Todas las cepas probadas de L. monocytogenes, tanto hemolíticas como no hemolíticas, han producido la muerte con generalización previa de la enfermedad, cuando fueron inoculadas por vía subdural en animales de laboratorio de distintas especies (conejo, cobaya, criceto y ratón). En atención a estos resultados se sugiere la posibilidad de reconsiderar la no patogenicidad de las cepas no hemolíticas de L. monocytogenes.

#### VIII. RESUMEN

En el presente trabajo, comenzado en 1.976 se ha realizado un estudio sistematico de heces ovinas y bovinas al objeto de determinar la incidencia de portadores fecales de microorga-nismos del género Listeria en las especies bovina y ovina de la región centro de España. Se han estudiado un total de 1.950 --muestras; 1.200 precedentes de ganado ovino y 750 de ganado bo-vino.

Desde un principio, se pudo comprobar el problema que/ supone el aislamiento de estos microorganismos, en un porcenta-je elevado de muestras, cuando se siguen los métodos habituales de someter las muestras a baja temperatura, intentando los a isla mientos 2 veces al mes durante un mínimo de seis meses.

Con el fin de mejorar el rendimiento de los métodos en uso, se ha investigado paralelamente la puesta a punto de una - nueva metodología tendente a simplificar el problema.

La nueva metodología, se desarrolló por una parte modi ficando la composición de los medios clásicos de recogida, enri quecimiento y aislamiento, tras repetidos ensayos y por otra -- aplicando un sistema de temperaturas de 22°C para los medios de enriquecimiento y aislamiento, y 4°C para los de recogida. Es- ta última temperatura se utilizó incluso durante la recogida y/ transporte de las muestras.

Los resultados obtenidos indican claramente que se ha/ obtenido una mayor eficacia en los aislamientos, incrementándo- se notablemente 10:1 el número de portadores fecales, consi-- guiendo los primeros aislamientos positivos a las 48 horas, y - recuperando prácticamente la totalidad de los microorganismos - del género a los 91 días de cultivo.

Debe destacarse, la frecuente presencia de la especie/ L. grayi en las heces de los animales muestréados, que ha alcan-

zando cifras de hasta el 80%.

Realizada la investigación de anticuerpos séricos por aglutinación lenta, se observa que el 41,2% del ganado vacuno - muestreado alcanzaban títulos superiores a 1/320, y el 33,8% -- del ganado ovino superaba el título 1/160.

En el curso de la presente investigación también se ha puesto a punto con óptimos resultados una técnica de análisis - en tubo, para investigar la presencia de hemolisinas en los microorganismos de este género.

### SUMMARY

A systematic research has been followed since 1.976 - to determine the carrier rate of Listeria in faeces from bovi--nes and sheep in the central region of Spain. A total of 1.950 samples (1.200 from sheep and 750 from cattle), have been stu--died.

From the beginning we could observe the great problem/ that entails the isolation of samples, by means of subcultures/ every two weeks for six months at least, and kept at low tempera--tures.

To improve the efficiency of the methods in use we de--veloped a new methodology leading to simplify the problem. It/ consisted of a comparative study of the classical media of - - collection, enrichment, and isolation with others developed du--ring the research period by altering their composition and also the temperature of incubation. The temperatures of the cultu--res were 4°C for collection media and 22°C for enrichment an --isolation ones.

The results clearly showed a great improvement in the/ efficiency of the isolation with a high increase (1000%) in the number of carriers with the new methodology. Recovery of mi- -croorganisms of the genus Listeria was first accomplished after at 48 hours of incubation and it was practically completed by - the 91st day of incubation. It should also be stressed the fre--quent presence of Listeria grayi in the feces (80% of the ani--mals sampled).

Once the study of serum antibodies by slow agglutina--tion had been carried out we found that 41,2% of cattle reached

titers higher than 1/320 and that 33,8% of sheep exceeded the -  
titer of 1/160.

During the present study, a technique of tube analysis/  
that renders optimal results for the presence of hemolysins in -  
the microorganisms of the genus Listeria has been achieved.





IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ackermann, W.H., and Audurier, A. Morphology of Listeria/monocytogenes typing phages. Seventh International Symposium on the Problems of Listeriosis. Varna, September -- 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia 1.979.
- 2.- Agarwal, L.P., Sood, N.N., Mahajan, V.M., and Bhujwala, - B.A. Experimental keratitis and uveitis in rabbits with/ L. monocytogenes. Seventh International Symposium on the Problems of Listeriosis. Varna, September 1.977. ed. -- Ivandv, I. Sofia 1.979.
- 3.- Alés Reinlein, J.M., Florez Alfa, C., Soriano García, F./ 1.974. Infección por Listeria monocytogenes. Revista -- Clínica Española, 133, 205 - 209.
- 4.- Alex, R. 1.955. Die approximative Häufigkeit der Liste--riose-infektion in der Schwangerschaft. Arch. Gynäkol./ 186, 381 - 384.
- 5.- Alex, R. 1.960. Mekoniumuntersuchungen beim Neugeborenen. Geburtsh. Frauenheilk, 20, 599 - 602.
- 6.- Allison, F.Jr., Smith, M.R., Wood, W.B.Jr. 1.955. Stu- - dies on the pathogenesis of acute inflammation. II The - action of cortisone on the inflammatory response to ther- mal injury. J. Exper. Med., 10, 669 -676.
- 7.- Andrews, M.F., Eveleth, D.F., and McIlwain, P.K. 1.960. - Preliminary report on the effect of hypoglycemias on Liste , riosis. Vet. Med., 55, 71 - 73.
- 8.- Annagiev, A.A. 1.959. Listerellez kur i aktivnaya profi- laktika evo. Veterinariya, 36, 20 - 21.

- 9.- Anton, W. 1.934. Kritisch-experimenteller Beitrag zur --  
Biologie des Bakterium monocytogenes. Mit besonderer --  
Berücksichtigung seiner Beziehung zur infektiösen Mononuk-  
leose des Menschen. Zbl. Bakteriол. Parasitenk. Abt.I.  
Orig., 131, 89 - 103.
- 10.- Apuntes de inmunología de la Escuela Nacional de Sanidad.  
Madrid 1.981.
- 11.- Asahi, O. Hosoda, T., and Akivana, Y. 1.957. Studies on/  
the mechanism of infection of the brain with Listeria mo-  
nocytogenes. Am.J.Vet.Res., 18, 147 - 157.
- 12.- Atkinson, E. 1.917. Meningitis associated with gram-posi  
tive bacilli of diphtheroid type. Med. J. Australia, 1,  
115 - 118.
- 13.- Attleberger, M.H., and Seibold, H.R. 1.956. Listeria in-  
fection of bovine lymph nodes. J. Am. Vet. Med. Assoc., -  
128, 202 - 204.
- 14.- Audurier, A., Pardon, P., Marly, J., Lautier, F. 1.980. -  
Experimental infection of mice with Listeria monocytoge--  
nes and Listeria innocua. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur,  
131 B, 47 - 57.
- 15.- Avery, R.J., and Byrne, J.L. 1.959. An attempt to deter-  
mine the incidence of Listeria monocytogenes in the brain  
of mammals. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 23, 296 - 300.
- 16.- Bacon, M., and Miller, N.G. 1.958. Two strains of Liste-  
ria monocytogenes (Pirie) isolated from fecal sources in/  
Washington. Northwest Sci., 32, 132 -139.
- 17.- Bearns, R.E., and Girard, K.F. 1.958. The effect of pas-  
teurization on Listeria monocytogenes. Can. J. Micro--  
biol., 4, 55 - 61.

- 18.- Bearns, R.E., and Girard, K.F. 1.959. On the isolation -  
of Listeria monocytogenes from biological specimens. Am./  
J. Méd. Technol., 25, 120 - 126.
- 19.- Beerens, H., et Tahon-Castel, M.M. 1.966. Milieu à l'aci-  
de nalidixique pour l'isolement des streptocoques, D. pneu-  
moniae, Listeria erysipelothrix. Ann. Inst. Pasteur, 111,  
90 - 93.
- 20.- Beganovic, H.A., Melanovic, A., and Forsek, Z. 1.971. Ve-  
terinaria, Saraj., 20, 73 - 80.
- 21.- Belin, M. 1.947. Contribution a l'etude de Listeria mono-  
cytogenes. Ann. Inst. Pasteur, 73, 99 - 101.
- 22.- Beute, A.E., Meyler, L., and Sirks, J.L. 1.948. Listerio-  
sis bijdemens in Nederland. Ned. Tijdschr. Geneesk., 92,  
2229 - 2236.
- 23.- Biegeleisen, J.Z.Jr. 1.964. Immunofluorescence techni- -  
ques in the retrospective diagnosis of human Listeriosis.  
J. Bacteriol., 87, 1257 - 1258.
- 24.- Biester, H.E., and Schwarte, L.H. 1.939. Studies on Lis-  
terella infection in Sheep. J. infect. Diseases, 64, - -  
135 - 144.
- 25.- Biester, H.E., and Schwarte, L.H. 1.940. Listerella in--  
fection in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc., 96, 339 - 342.
- 26.- Biester, H.E., and Schwarte, L.H. 1.941. Bovine listere-  
llosis in Iowa with studies on a recovered case. North./  
Am. Vet., 22, 729 - 734.
- 27.- Bilibin, A.F. 1.949. Listerellosis in man. Klinich Med.,/  
27, 48 - 54.

- 28.- Blanden, R.V., Mackaness, G.B., Collins, F.M. 1.966. Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. *J. Exper. Med.*, 124, 585 - 591.
- 29.- Blanden, D.C., Gates, G.A., and Khon, M.S. 1.968. *Am. J. Vet. Res.*, 29, 2237 - 2242.
- 30.- C.H. Boehringer sohn ingelheim S. A.E. *Sinopsis de Patología y Clínica Infecciosa (Pediatria)*.
- 31.- Boekels, H. 1.950. Ein Beitrag zur Agglutinations Technik mit Listeria monocytogenes unter besonderer Berücksichtigung der dabei optimalen Kochsalzdichte. Dissertation, - Justus Leibig Univ., Giessen.
- 32.- Bojsen-Møller, J. Second International Symposium on the Problems of Listeriosis. Montana 1.962. ed. Gray, M.L./ Bozeman: Artcraft. Printers.
- 33.- Bojsen-Møller, J., 1.964. Occurrence of Listeria monocytogenes in feces from healthy and sick persons. *Proc. - Scand. Congr. Pathol. Microbiol.*, 14th Oslo, 97 - 98. ed. Norwegian Universities Press.
- 34.- Bojsen-Møller, J., Jessen, O., and Lautrop, H. Human listeriosis in Denmark 1.958 - 1.974. Sixth International Symposium on the problems of Listeriosis Nottingham, - September 1.977. ed. Woodbine, M. Leicester University Press 1.975.
- 35.- Borman, G., Olson, C., and Segre, D. 1.960. The trigeminal and facial nerves as pathways for infection of sheep/ with Listeria monocytogenes. *Am. J. Vet. Res.*, 21, 993 - 1.000.
- 36.- Botzler, R.G., Wetzler, T.F., Cowan, A.B. 1.973. Listeria in aquatic animals. *Journal of Wildlife Diseases*, 9, / 163 - 170.

- 37.- Brandevurova, O., and Koppel, Z. Study of some taxonomic tests for the determination of listeria organisms. Seventh International Symposium on the Problems of Listeriosis. - Varna, September 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia 1.979.
- 38.- Braveng, I., and Grote, R. 1.973. Ein Selekttiussubstanze isolierung von Listeria monocytogenes. Experientia, 29, - 1553 - 1555.
- 39.- Breed, R.S., Murray, E.G.D., and Smith, N.R. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. ed. Willians and Wilkins, 7th ed., Baltimore 1.957.
- 40.- Brennaas, O., Brochmann, A. 1.959. Listeria infection in in a patient with lymphosarcoma. J. Oslo city, 9, 219-228.
- 41.- Breuning, M., and Fritzsche, F. 1.954. Über die Häufigkeit der Listeriose bei Neugeborenen; Untersuchugen an -- der Universitäts-Frauenklinik, Leipzig. Greburtsh. Frauenheilk, 14, 1113 - 1124.
- 42.- Brzin, B., and Seeliger H.P.R. 1.974. AA brief note on -- the camp phenomenon in Listeria. Sixth International Symposium on the Problems of Listeriosis Nottingham, September 1.977. ed. Woodbine, M. Leicester University Press - 1.975.
- 43.- Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Willllians and Wilkins 8th ed., 7 Baltimore 1.974.
- 44.- Burenkova, N.A., 1.959. Procedure of preparing listerio-- sis antigen for the indirect haemagglutination test. Zbl. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 30, 136 - 138.

- 44b.-Burkwall, M.K., and Hartman, P.A. 1.964. Comparison of/  
direct plating medium for the isolation and enumeration  
of enterococci in certain frozen foods. Appl. Microbiol.  
12, 18 - 23.
- 45.- Burn, C.G. 1.936. Clinical and pathological features of/  
an infection caused by a new pathogen of the genus Liste-  
rella., n. sp., Am. J. Pathol., 12, 341 - 348.
- 46.- Buttiaux, R., Beerens, M., et Tacquet, A., Manuel de Tech-  
niques Bacteriologiques, ed. Flammarion Medicine-Scien--  
ces, Paris, 1.974.
- 47.- Butko, M.P. Importance of some chemical substances and -  
antibiotics as medium constituents for isolation of Liste-  
ria from biological material. Seventh International Sym-  
posium on the Problems of Listeriosis. Varna, September/  
1.977. ed. Ivanov, I. Sofia 1.979.
- 48.- Carey, B.W. 1.936. J. Pediat 8, 626 - 629.
- 49.- Castenada, M.R. 1.950. Surface fixation. A new method -  
of detecting certain immunological reactions. Proc. Soc.  
Exptl. Biol. Med., 73, 46 - 49.
- 50.- Clavel Parrilla A., Castillo García, F.I. 1.980. Lis-  
teriosis. Immunologica revisiones 58 - 68.
- 51.- Collins, C.H., Métodos Microbiológicos, ed. Acribia, Zara  
goza, 1.969.
- 52.- Collins, D., Feresu, S., and Jones, D. Chemical studies/  
of the genera Listeria, Brochothrix, Lactobacillus and so  
me atypical lactobacilli. Eight International Symposium/  
on the Problems of Listeriosis. Madrid, September 1.981.  
ed. Centro especial Ramón y Cajal. Madrid 1.981.

- 53.- Cooper, R.F., and Denis, S.M. 1.978. Further Characterization of Listeria monocytogenes serotype 5 Can. J. Microbiol., 24, 598 - 599.
- 54.- Cordy, D.R., and Osebold, I.W. 1.959. The neuropathogenesis of Listeria encephalomyelitis in sheep and mice./ J. Infect. Diseases., 104, 164 - 173.
- 55.- Cormier, M. 1.977. Transfert du pouvoir pathogene -- d'une souche virulente de listeria à une souche non virulente. C.R. Acad. Sc. Paris, 284. Serie D, 2055 - 2057.
- 56a.-Cotoni, I. 1.942. A propos des bacteries denommees Listeria rappel d'une observation ancienne de menengite chez - l'homme. Ann. Inst. Pasteur. 68, 92 - 95.
- 56b.-Cottin, J., Kouyoumdjian, S., Deshayes, P., Carbonnelle, B., Cordiez, F., and Vincent, F. Analysis of an epidemic of listeriosis in the Maine and Anjou during the years -- 1.975 - 1.976. Seventh International Symposium on the Problems of Listeriosis. Varna, September 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia 1.979.
- 57.- Courtier, A.L., Drugeón, H.B., Billaudel, S., Reynaud, A., and Chund, S.S. Bacteriostatic and Bactericidal activities of six penicillins and cephalotine on Listeria. - - Eight International Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid 1.981.
- 58.- Cowan, S.T., and Steel, K.I., Manual for the Identification of Medical Bacteria, ed. Cambridge University Press, 3th ed., London 1.973.
- 59.- Cox, B.F. 1.945. Listerellosis of dogs. Auburn Vet., - 98 - 99.



- 60.- Cromberg, S., Larsson, S., Moestrup, T. In vitro resistance of *L. monocytogenes* to the newer cephalosporins and -- comparison with other antibiotics. Eight International - Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid - - 1.981.
- 61.- Csontos, L. Derzsy, D. and Baranyi, I.T. 1.955. Listeriosis in young geese. Acta Vet. Hung., 5, 261 - 277.
- 62.- Cummings, M.M., Hudgins, P.C. The influence of cortisone/ on the passive transfer of tuberculin hypersensitivity in the guinea pig. J. Immunol., 69, 331 - 335.
- 63.- Czuprynski, Ch. I., and Balish, E., 1.981. Pathogenesis/ of Listeria monocytogenes for gnotobiotic rats. Infect./ Immun., 32, 323 - 331.
- 64.- Czwalińska, I. 1.956. Untersuchungen über die Brauchbarkeit verschiedener Listeria monocytogenes-Teste. Dissertation Freien Llaiv., Berlin. (citado por Gray y col. - - 1.966).
- 65.- Daguet, G.L. Técnicas en Bacteriología, I - Aerobios. ed. Jims, 1ª ed., Barcelona 1.977.
- 66.- Daguet, G.L. y Chabbert, Y.A. Técnicas en Bacteriología, III - Serología Bacteriana, Antibióticos en Bacteriología Médica; ed. Jims, 1ª ed., Barcelona 1.977.
- 67.- Dedič, K. 1.955. Beitrag zur Epizootologie der Listeriose. Arch. Exptl. Veterinaermed., 9, 251 - 264.
- 68.- Dedič, K., and Schulze. 1.957. Die Hitzeresistenz von -- Listeria monocytogenes in Milch. Berlin. Muench. Tier--- - raerztl. Wochschr., 70, 231 - 232.

- 69.- Dedić, K. 1.958. Weitere experimentelle und Untersuchungs-  
befunde zur Listeriose bei Tieren, P. 99 - 109. ed. - -  
Roots, E. and Strauch, D. Listeriosen. Beiheft I, Zentr.  
Veterinär. Med. Paul Paray Verlag, Berlin 1.958.
- 70.- Demyanchenco, G.F., and Baranekov, M.A. 1.970. Medskaya.  
Parazit., 39, 573 - 577.
- 71.- Despieres, M. 1.971. Isolement de Listeria monocytoge--  
nes dans un milieu défaro rable a streptococcus faecalis.  
Ann. Inst. Pasteur., 121, 493 - 501.
- 72.- Dhanda, M.R., and Sekaria, P.C. 1.959. Studies on the  
Bacteriology of pneumonia in sheep and goats. II. On the  
isolation of Erysipelothrix (Listeria) monocytogenes from  
the pneumonic lungs of sheep and goats. Indian J. Pathol  
Bacteriol., 1, 175 - 184.
- 73.- Difco, Manual de Bacteriología, Recopilación de Técnicas,  
ed. Difco Laboratories Inc., Madrid, 1.973.
- 74.- Dijk, H. van, Hofhvis, F.M.A., Berens, E. M.J.J. - -  
Meer, C. Vander, and Willers, J.M. 1.980. Killed Liste--  
ria monocytogenes vaccine is protective in C<sub>3</sub>H/He J mi-  
ce without addition of adjuvants. Nature., 286 (5774), -  
713 - 714.
- 75.- Dijkstra, R.G. 1.974. Recent experiences on the survi--  
val times of Listeria bacteria in suspensions of brain --  
tissue, silage, faeces and milse.
- 76.- Dijkstra, R.G. L. monocytogenes in intestinal contents --,  
and faeces from healthy broilers of different ages in the  
litter and its potential danger for other animals, i.c. --  
Cattle. Seventh International Symposium on the Problems/  
of Listeriosis. Varna, September 1.977. ed. Ivanov, I. -  
Sofia 1.979.

- 77.- Donker-Voet, J. 1.959. A serological study of some - - - strains of Listeria monocytogenes, isolated in Michigan./ Am. J. Vet. Res. 20, 176 - 179.
- 78.- Donker-Voet, J. Third International Symposium on the problems of Listeriosis. Bilthoven 1.966. ed. The Organizing Committee.
- 79.- Döntenwill, W., and Knothf, H. 1.956. Die pathologisch-- histologische Diagnose der Listeriose im bebrüteten Hüh-- nerei. Arzneimittel. Wochschr., 11, 204 - 206.
- 80.- Dunaeva, T.N. 1.957. Novaia model dlia biolgicheskogo -- issledovaniia pri listerioze. Zbl. Mikrobiol. Epide-- miol. Immunobiol., 28, 1268 - 1272.
- 81.- Durst, J., and Berencsi, G. Data about listeriosis in -- Hungary. Sixth International Symposium on the problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.977. ed. Woodbine, M. Leicester University Press. 1.975.
- 82.- Durst, J. 1.975. New selective media of rivanol content for Listeria monocytogenes cultures. Zbl. Bacteriol. - - Parasitenkde. Infekt. Krankh.
- 83.- Dustoor, M.M., and Blazkover, A.A. 1.978. Acquired ce-- llular resistance, delayed hypersensitivity and altered - macrophage migration in Listeria monocytogenes. Infected Guinea pigs. Infec. and Immun., 21, 10 - 16.

- 84.- Eck, H. 1.957. Encephalomyelitis Listeriaca apostematosa. Schweiz. Med. Wochschr., 87, 210.
- 85.- Edwards, M.R., and R.W. Stevens. 1.963. Fine structure of Listeria monocytogenes. J. Bacteriol., 86, 414 - 428.
- 86.- Elischerova, D., and Stupalova, S. 1.972. Listeriosis - in proffessionally exposed persons. Acta microbiol. - - Acad. Sci. Hung., 19, 379 - 384.
- 87.- Elischerova, K., Stupalova, S., and Stepanek, J. Some ecological aspects of Listeria monocytogenes in meat industry. Seventh International Symposium on the Problems of/ Listeriosis. Varna, September 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia 1.979.
- 88.- Emile, J., and Bazim, C. Listeria neuromeningitis in the adult. Sixth International Symposium on the problems of/ Listeriosis. Nottingham, September 1.977. ed. Woodbine, M. Leicester University Press 1.975.
- 89.- Emödy, L., Wemeth, A., and Fischer, J. Histopathological/ investigation of mice infected with virulent and avirulent Listeria monocytogenes strains. Seventh International Symposium on the problems of Listeriosis. Varna, September - 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia 1.979.
- 90.- Emödy, L., and Ralovich, B. Listeria infection in mice./ Sixth International Symposium on the problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University Press 1.975.
- 91.- Ericsson, M., and Sherris, J.C. 1.971. Antibiotic Sensitivity testings. Report of an International Collaboration study. Acta pathologica et microbiologica scandinavica,/ secc. B, Pag. 271.

- 92.- Errebo, L.H. and Seeliger, M.P.R. A mannitol fermenting Listeria, Listeria grayi sp. Third International -- Symposium on the problems of Listeriosis. Bilthoven July/1.966. ed. The Organizing Committee.
- 93.- Espaze, E.P..and Courtien, A.L. Action in vitro of - some antibiotic combinations on Listeria monocytogenes./ Seventh International Symposium on the problems of Listeriosis. Varna, September 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia - - 1.979.
- 94.- Evans, J.B., and Chris, A. Pate. 1.980. Method for determining anaerobic fermentation of mannitol by staphylococci International Journal of Systematic Bacteriology 30, -- 557 - 558.
- 95.- Eveleth, D.F., Goldsby, A.I., Bolin, F.M., Holm G.C./ and Turn, J. 1.953. Field trials and laboratory tests - - with Listeria bacterins. Proc. Am. Vet. Med. Assoc., - - 154 - 155.
- 96.- Fare, R.M., and Delannay, A., 1.967. Resistance cellulaire a l'infection bacterienne. VI Influences exerc  e in vitro par l'ingestion de bactericide des macrophages   - l'egard de Listeria monocytogenes. Ann. Inst. Pasteur, - 112, 458 - 465.
- 97.- Feindt, E. Inaug. Diss. Würzburg 1.972
- 98.- Felsenfeld, O. 1.951. Diseases of poultry transmissible to man. Iowa State Coll. Vet, 13, 89 - 92.
- 99.- Felsenfeld, O. 1.958. Listerella monocytogenes strain -- isolated from a human source in Puerto Rico. Puerto Rico J. Public Health 24, 24 - 30.

- 100.- Fischer, J. T. 1.941. Las meningoencefalitis a Listeria monocytogenes: a propósito del primer caso identificado en Sud. América. Arch. Urug. Med. Cir. Especialid, - 18, 156 - 170.
- 101.- Flamm, H. 1.955. Die patho-histologische Diagnose der -- Listeriose im Tierversuch. Schweiz. Z. Allgem. Pathol. - Bakteriolog. 18, 270 - 277.
- 102.- Flamm, M. and Zehetbauer, G. 1.956. Die Listeriose des - Auges im Tierversuch. Graefes Arch. Ophthalmol. 158, --- 122 - 135.
- 103.- Forray, A., and Angyal, T. Investigations to isolate Listeria organism in media containing oxalinic acid. Seventh International Symposium on the problems of Listeriosis. Varna. September 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia - -- 1.979.
- 104.- Frenkel, J. K. 1.960. Evaluation of infection enhancing/ activity of modified corticoids. Proc. soc. Exper. Biol. Med. 120, 283 - 289.
- 105.- Friedman, M.E., and Alm, W.L. 1.962. Effect of glucose concentration in the growth medium on some metabolic activities of Listeria monocytogenes. J. Bacteriol., - 84, 375 - 376.
- 106.- Fuhs, G.W. and Seeliger, H.P.R. 1.961. Zur Begei- - sselung von Listeria monocytogenes elektronenoptische - and serologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. 40, -- 153 - 162.
- 107.- Fúzi, M., and Pillis, I. 1.961. Preparation of sta- -- ble Listeria monocytogenes "O" antigen. J. Bacteriol. 81, 155 - 156.

- 108.- Gantz, N.M., Myerowitz, R.L., Medeiros, A.A., Carrera, -  
G.F., Wilson, R.E., O'Brien, T.F. 1.975. Listeriosis en/  
tratamiento con inmonosupresores: un grupo de ocho ca- -  
sos. Am. J. Med. ed. Esp. 1 (5), 512 - 518.
- 109.- García, E.Y., and Manahan, M.C. 1.964. Laboratory Diag-  
nosis of Listeria Infections in Native Filipinas Jour. --  
P.M.A. 40 (3), 169 - 176.
- 110.- Gaston de Iriarte, E. Técnicas de análisis y controles -  
en Microbiología, ed. Augusta S.A. 2ª ed. Barcelona - --  
1.971.
- 111.- Gill, D.A. 1.937. Circling disease: a meningoencephali--  
tis of sheep in New Zealand. Notes on a new species of --  
pathogenic organism. Vet. J. 89, 258 - 270.
- 112.- Gill, D.A. 1.937. Ovine bacterial encephalitis (circling  
Disease) and the bacterial genus Listerella. Australian/  
Vet. J. 13, 46 - 56.
- 113.- Girard, K.F., Sbarra, A.J., and Bardawill, W.A. 1.963. -  
Serology of Listeria monocytogenes. I. Characteristics -  
of the soluble hemolysin. J. Bacteriol. 85, 349 - 355.
- 114.- Gómez-Mampaso, E., Michaux, L., Rafael, L., Carvajal, A.  
and Baquero, F. 1.974. Fecal Listeria monocytogenes ca--  
rriers and perinatal mortality. Sixth International Sym-  
posium on the problems of Listeriosis. Nottingham, Sep--  
tember 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University - -  
Press 1.975.
- 115.- Gómez-Mampaso, E. Michaux S.L., Martínez, R. 1.975. Por-  
tadores fecales y vaginales de Listeria monocytogenes. -  
Quinto Congreso Nacional de Microbiología. Salamanca. Oc-  
tubre 1.975.

- 116.- Gómez-Mampaso, E. 1.978. Listeria monocytogenes: Estudio de ciento cuarenta y una (141) cepas de origen humano. - Comunicación personal.
- 117.- Gómez-Mampaso, E. 1.978. Comunicación personal.
- 118.- Gouet, Ph. 1.974. Growth of Listeriella monocytogenes ng notoxenia silages of maize, ray-grass, fescue and lucerne. Sixth international Symposium on the problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M./Leicester University Press 1.975.
- 119.- Graham, R., Levine, N.D., and Morrill, C.C. 1.943. Listerellosis in domestic animals. Univ. III. Agr. Expt. Sta. Bull. 499.
- 120.- Gram, M.G. 1.955. Ein Fall von Listeriameningitis bei einem Erwachsenen in Baden. Medizinische 18, 683 - 684.
- 121.- Grangeponde, M.C., Pelletier, J., Coquery, M.C. et Joubert, P. 1.971. Etude anatomo-pathologique des Listerioses humaines. Sem. Hosp. Paris 47 (43-44), 2.503 - 2.508.
- 122.- Gray, M.L. Dato no publicado. Citado por Gray Mcol 134.
- 123.- Gray, M.L., Stafseth, H.J., Thorp, F., Jr., Sholl, L.B., and Riley, W.F., Jr. 1.948. A new technique for isolating Listerellae from the bovine brain. J. Bacteriol. - 55, 471 - 476.
- 124.- Gray, M.L. Stalst, H.J., and Thorp, F., Jr. 1.950. The use of sodium azide, potassium tellurite, and acetic acid in a selective medium for the isolation of Listeria monocytogenes. J. Bacteriol, 50, 443 - 444.
- 125.- Gray, M.L., Stafseth H.J., and Thorp, F. Jr. 1.951. A four year study of Listeriosis in Michigan. J. Am. Vet. Med. Assoc. 188, 242 - 252.



- 126.- Gray, M.L., Laine, S.L., and Thorp, F., Jr. 1.952. The effect of aureomycin on Listeria monocytogenes on the production of encephalic symptoms in rabbits. Antibiot. Chemotherapy 2, 537 - 543.
- 127.- Gray, M.L. 1.957. A rapid method for the detection of colonies of Listeria monocytogenes. Zbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Abt. I. Orig. 169, 373 - 377.
- 128.- Gray, M.L. Experimental listeriosis in pregnant animals. ed. Roots and D. Strauch Listeriosen. Beiheft I, Zbl. // Veterinäre Med. Paul Parey Verlag, Berlin 1.958.
- 129.- Gray, M.L. 1.958. Listeriosis in fowls, a review. Avian Diseases 2, 296 - 314.
- 130.- Gray, M.L. 1.960. Genital Listeriosis as a cause of repeated abortion. Lancet 2, 315 - 317.
- 131.- Gray, M.L. 1960. Isolation of Listeria monocytogenes - - from oat silage. Science 132, 1.767 - 1.768.
- 132.- Gray, M.L. Infections due to Listeria monocytogenes in wildlife. Trans 29 Th North Am. Wildlife and Natural Resources conf., 29, 202 - 214. (1.964).
- 133.- Gray, M.L. and Killinger M. 1.966. Listeria monocytogenes and Listeria Infections. Bacteriol. Rev. 30 (2), - - 309 - 382.
- 134.- Griffin, A.M., and Robbins M.L. 1.944. The flagellation of Listeria monocytogenes. J. Bacteriol. 48, 114 - 115.
- 135.- Grini, O. 1.943. Listerella monocytogenes. Som årsak til septico pyemi hos fjell. Norsk. Vet. Tidsskr. 55, 97 - 101.
- 136.- Grund, S. 1.963. Komplexe intracytoplasmatischer Membranen bei Listeria monocytogenes. Zbl. Bakteriologie. Parasitenkunde. Abt. I Orig. 189, 405 - 429.

- 137.- Guillot, E.P., and McCleskey, C.S. 1963. Phage susceptibility of Listeria monocytogenes. Bacteriol. Proc. Pag. 139.
- 138.- Hahnefeld, H., and Hahnefeld, E. 1959. Untersuchungen - zur Frage der peroralen Listeria monocytogenes. Infek- - tion bei Kaninchen mit besonderer Berücksichtigung der Gravidität. Arch. Exptl. Veterinaarmed. 13, 897 - 943.
- 139.- Harbov, D.D., Veljanov, d. K., and Toschkoff, Al. S. - - 1976. On the changes in the virulence of Listeria mono- cytogenes in the blood sucked by certain ixodic ticks. - Compt. rend. Acad. bulg. Sci., 29 (1), 109 - 112.
- 140.- Harbov, D.D., Toschkoff, Al. S., and Veljanov D.K. 1979. On the interrelations between Listeria monocytogenes and the ticks of the Rhipicephalus bursa species. Compt. - - rend. Acad. bulg. Sci., 32 (11), 1543 - 1547.
- 141.- Harrigan, W.F. and McCance, M.E. Métodos de laboratorio en Microbiología de Alimentos. Academia, León 1979.
- 142.- Harrison, K.A., Seaman, A., and Woodbine M. 1974. Inhi- bition of Listeria monocytogenes haemolysis by oestra- - diol 17B. Sixth International Symposium on the Problems - of Listeriosis. Nottingham, September 1974. ed. Woodbi- ne, M. Leicester University Press 1975.
- 143.- Hartwigk, H., and Grund, S. 1956. Elektronenmikroskopis- che Untersuchungen an Listeria monocytogenes. Zentr. Ve- terinaarmed. 3, 232 - 238.
- 144.- Hasenclever, H.F., and Karkawa, W.N. 1957. Immunization of mice against L. monocytogenes. J. Bact., 74, 584 - -- 590.
- 145.- Henry, B.S. 1933. Dissociation in the genus Brucella. - n. sp., J. Infect. Diseases. 52, 374 - 402.

- 146.- Hobson, D. 1.957. Resistance to reinfection in experimental mouse typhoid. J. Hyg., 55, 334 - 336.
- 147.- Hof, H., Emmerling, P., and Seeliger, H.P.R. Experimental Listeria infection in the compromised murine host. -- Seventh International Symposium on the Problems of Listeriosis. Varna, September 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia -- 1.979.
- 148.- Holland, J.J., and Pickett, M.J. 1.958. A cellular basis/ of immunity in experimental Brucella infection. J. Exper. Med., 108, 343 - 348.
- 149.- Hühne, K., Loose, B., and Seeliger, H.P.R. 1.975. Isolation of L. monocytogenes in slaughter animals and bats of Togo (West. Africa). Ann. Microbiol. Inst. Pasteur., 126/ A, 501 - 507.
- 150.- Hülphers, G. 1.911. Lefvernekros hos Kanin orsakad af - en ej förut beskrifven bakterie. Sven. Vet. Tidskr. 16, - 265 - 173. Reprinted. 1.959, Medlemsbl. Sverge, Vet. Förb. 11 (Suppl.), 10 - 16.
- 151.- Hyslop, M. St. G., and Osborne, A.D. 1.959. Vet. Rec., 71, 1.082 - 1.095.
- 152.- Hyslop. N. St. G. 1.961. H.V.Sc. thesis University of Liverpool.
- 153.- Hyslop, N.St.G. 1.974. Epidemiologic and immunologic factors in listeriosis. Sixth International Symposium on the Problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University Press 1.975.
- 154.- Ivanov, I. 1.957. Listeriose chez les ovins et les caprins. Bull. off. Int. Epiz. 48, 571 - 583.
- 155.- Ivanov, I. 1.962. Untersuchungen über die Listeriose der/ Schafe in Bulgarien. Monatsh. Veterinärmed. 17, 729-736.

- 156.- Ivanov, I. Establishment of nonmotile strains of Listeria monocytogenes type 5. Sixth International Symposium/  
on the problems of Listeriosis. Nottingham, September - -  
1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University Press 1.975.
- 157.- Ivanov, I., and Masalski, N. Listeriosis in Bulgaria. --  
Seventh International Symposium on the problems of Listeriosis. Varna, September 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia - -  
1.979.
- 158.- Ivanov, I. V. Results of the administration of the live/  
attenuated vaccine against listeriosis in sheep in Bulgaria. Eighth International Symposium on the problems of --  
Listeriosis. Madrid. September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.
- 159.- Ivanov, I., Dikova, Tsv. A short communication: A method  
to demonstrate the immunogenicity of a Listeriosis vaccine. Eighth International Symposium on the problems of ---  
Listeriosis. Madrid. September 1.981. ed. Centro Especial  
Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.
- 159b.-Ivanov, I. 1.981. Comunicación personal.
- 160.- Jack, E.J. 1.961. Vet. Rec. 73, 826 - 830.
- 161.- Jahn, E. 1.906. Myxomyceten studien, n. sp., Ber Deut. --  
Bot. Ges., 24, 538 - 541.
- 162.- Jansen, H., and Larsen, H.E. 1.973. Nord: Vet. Med., 25,  
322 - 329.
- 163.- Jasinska, S. 1.964. Bacteriophages of lysogenic strains/  
of Listeria monocytogenes. Acta. Microbiol. Polon. 13, -  
24 - 43.
- 164.- Jenkin, C., Benacerraf, B. 1.960. In vitro studies on -  
the interaction between mouse peritoneal macrophages and

- strains of Salmonella and Escherichia coli. J. Exper. -- Med. 112, 403 - 408.
- 165.- Jenkins, E.M., Njoku-Obi, A.N., and Adams, E.W. 1.964. - Purification of the soluble hemolysins of Listeria monocytogenes. J. Bacteriol., 88, 418 - 424.
- 166.- Jones, D. 1.974. The taxonomic position of Listeria. - Sixth International Symposium on the problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M. -- Leicester University Press 1.975.
- 167.- Julianelle, L.A., and Pons, C.A. 1.939. Identification - of Listerella monocytogenes, n.sp., Proc. Soc. Exptl. -- Biol. Med. 40, 362 - 363.
- 168.- Kampelmacher, E.H., Donker-Voet, J., Noorle Jansen, L.M. Listeriosis in man and animals in the Netherlands 1.955-1.965. Third International Symposium on the problems of Listeriosis. Biltoven 1.966. ed. The Organizing Committee.
- 169.- Kampelmacher, E.H., and Noorle Jansen, L.M. 1.961. Listeriose bei Mensch und Tier in den Neederland von 1.956-1.960. Wien. Tieraerztl. Monatsschr., 48, 442 - 448.
- 170.- Kampelmacher, E.H. 1.967. Letter to the Editor. Lancet., 21, pag. 165.
- 171.- Kampelmacher, E.H., and Noorle Jansen, L.M. 1.969. Isolation of Listeria monocytogenes from faeces of clinically healthy humans and animals. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt./Orig., 211, 353 - 359.
- 172.- Kampelmacher, E.H., Huysinga, W.Th., and Noorle Jansen/L.M. 1.972. The presence of Listeria monocytogenes in faeces of pregnant women and neonates. Zbl. Bakt. Hyg. I.

Abt. Orig. A, 222, 258 - 262.

- 173.- Kampelmacher, E.H., and Noorle Jansen L.M., 1.972. Further studies on the isolation of L. monocytogenes in -- clinically healthy individuals. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A, 221, 70 - 77.
- 174.- Kampelmacher, E.H., and Noorle Jansen L.M. 1.974. Occurrence of L. monocytogenes in effluents. Sixth International Symposium on the problems of Listeriosis. Nottingham, September, 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University Press 1.975.
- 175.- Kampelmacher, E.H., and Noorle Jansen, L.M. 1.980. Listeriosis in humans and animals in the Netherlands - - - (1.958 -1.977). Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A., 246, 211-227.
- 176.- Kawata, T. 1.963. Fine structure of intracytoplasmic -- membrane system in Listeria monocytogenes. J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 1 - 13.
- 177.- Keeler, R.F., and Gray, M.L. 1.960. Antigenic and related biochemical properties of Listeria monocytogenes I. Preparation and composition of cell wall material. J.-- Bacteriol. 80. 683 - 695.
- 178.- Kemenes, F. 1.955. Isolation of Listeria from infected/ sheep in Hungary. Magy Allatorv. Lapja, 10, 115 - 118.
- 179.- Kemenes, F., Durst, J., Sűvages, T., Ványi, A., and -- Berencsi, Gy. 1.981. A new method for the isolation - of Listeria monocytogenes from contaminated materials. Eigth International Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, September, 1.981. ed. Centro Especial - Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.

- 180.- Khan, M.A., Seaman, A., and Woodbine, M. 1.972. The pathogenicity of Listeria monocytogenes. Acta microbiol. - Acad. Sci. hung., 19, 371 - 372.
- 181.- Khan, M.A., Seaman, A., and Woodbine, M. 1.973. Differential media in the isolation of L. monocytogenes. Zbl. Bakt. Parasit. Abt. I. Orig. A., 224, 362 - 375.
- 182.- Khan, M.A., Seaman, A., and Woodbine, M. Synergic drug - treatment in experimental listeriosis. Sixth International Symposium on the Problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University/Press. 1.975.
- 183.- King, E.O., and Seeliger, H.P.R. 1.959. Serological types of Listeria monocytogenes occurring in the United - - States. J. Bacteriol., 77, 122 - 123.
- 184.- Kite, P. Obstetric and neonatal listeriosis-case histories and placental screening. Sixth International Symposium on the Problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University Press. 1.975.
- 185.- Kleikamp, I. 1.959. Einfluss der temperatur und der Co<sub>2</sub> konzentration auf die Beweglichkeit und Hämolysebildung/ bei Listeria monocytogenes. Dissertation, Justus Leibig/Univ., Giessen.
- 186.- Krammer, P.A., and Jones, D. 1.969. Selective media for L. monocytogenes. J. Appl. Bact., 32, 381 - 394.
- 187.- Lados, P.W., Denis, S.M., Cooper, R.F. 1.974. Sequential dies of experimentally induced ovine Listerial abortion: Clinical changes and bacteriologic changes and - - bacteriologic examination. Am. J. Vet. Res., 35, - - - 155 - 157.

- 188.- Lamotte, M., Estadística Biológica principios fundamentales. ed. Toray-Masson. S.A., 3ª ed., Barcelona 1.971.
- 189.- Larsson Sture. 1.979. Epidemiology of Listeriosis in - - Sweden 1.958 - 1.974. Scand. J. Infect. Dis. II, 47 - 54.
- 190.- Lehnert, C. 1.964. Bakteriologische, serologische und - tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese, Epi- - zootologie und Prophylaxe der Listeriose. Archiv. für Ex perimentelle veterinaermedizin., 18, 981 - 1027.
- 191.- Leifson, E., and Palen, M.I. 1.955. Variations and spon taneous mutations in the genus Listeria in respect to fla gellation and motility. J. Bacteriol., 70, 233 - 240.
- 192.- Leighton, I. 1.979. Use of selective agents for the iso lation of Listeria monocytogenes. Med. Laboratory Scien ces., 36, 283 - 288.
- 193.- Libonatti, E.J., Manzullo, A., Balsechi, E.E., Horowitz, / I., and Manzullo, E.C. Listeric infection in tocogyneco logy. Sixth International Symposium on the Problems of - Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University Press. 1.975.
- 194.- Løken, T., Grønstøl, H., and Aspøy, E. 1.981. An epide miological investigation in a goat herd with outbreaks of Listeriosis and in one healthy herd. Eight International Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, Sep - tember 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid 1.981.
- 195.- Lucas, A., and Seeliger, H.P.R. 1.957. Etude sur la Lis teriose et Listeria monocytogenes dans quelques especes - animales. Recueil. Méd. Vét., 100, 373 - 378.
- 196.- Llucian, M., Martínez, M.C., y Sanchis-Bayani, V. 1.979.



Estudio de dos casos de meningitis por Listeria monocytogenes. Med. Clin., 72, 381 - 383. \*

- 197.- McBride, M.E., and Girard, K.F. 1.960. A selective method for the isolation of Listeria monocytogenes from mixed bacterial populations. J. Lab. Clin. Med., 55, 153 - 157.
- 198.- MacCrum, M.W., Evaland, W.C., Wetzler, T.F., and Cowan, A. B. 1.967. Listeria monocytogenes in the feces of White-tailed Deer (Odocoileus virginianus). Bull. Wildlife. - Disease. Assoc., 3, 93 - 101.
- 199.- MacKanness, G.B., Blanden, R.V., 1.967. Cellular immunity. Prog. Allergy. II., 89 - 91.
- 200.- MacKanness, G.B., 1.969. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo., J. Exper. Med., 129, 973 - 978.
- 201.- Mandel, T.E., and Cheers, C. 1.980. Resistance and Susceptibility of mice to bacterial infection: histopathology of listeriosis in resistant and susceptible strains. - Infect. Immun., 30 (30), 851 - 861.
- 202.- Manew, CH., Stoyanov, D., Mateva, M. 1.981. Comparative studies on the pathogenicity of Listeria innocua and Listeria monocytogenes strains. Eight International Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, September - 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.
- 203.- Mathews, F.P. 1.928. Encephalitis in calves., n. sp., J. Am. Vet. Med. Assoc., 73, 513 - 516.
- 204.- Mavrothalassitis, P. 1.977. A method for the rapid isolation of Listeria monocytogenes from infected material./ J. Appl. Bacteriol., 43, 47 - 52.

- 205.- Meer, C. Van der, Hofhuis, F.M.A., Willers, J.M.W. 1.977.  
Killed Listeria monocytogenes vaccine becomes protective/  
on addition of polyanions. Nature 269 (5629), 594 - 595.
- 206.- Mellado Pollo, A. 1.977. Listeria monocytogenes en gan--  
glios mesentéricos de bóvidos aparentemente sanos. Labora--  
torio, 63, 1 - 8.
- 207.- Mero, E., and Steuer, W. 1.981. Ocurrance of Listeria mo--  
nocytogenes in effluent of sewage treatment plants and in  
receiving body river water. Eight International Sympo--  
sium on the Problems of Listeriosis. Madrid, September -  
1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.
- 208.- Meseguer, M., Baquero, M., Gómez-Mampaso, E., Rafael, L.,  
Buzon, L. Listeriosis in the adult patient: report of --  
eight cases. Eight International Symposium on the Pro--  
blems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Cen--  
tro Especial Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.
- 209.- Miki, K., and Mackaness, G.B. 1.964. The passive trans--  
fer of acquired resistence to Listeria monocytoenes./  
J. Exper. Med., 120, 93 - 96.
- 210.- Miller, I.L., and Silverman, S.I. 1.959. Glucose metabo--  
lism of Listeria monocytogenes. Bacteriol. Proc., pág./  
103.
- 211.- Miller, J.K., and Muraschi, T.F. 1.961. The pathogenesis  
of Listeriosis in the pregnant rabbit. Bacteriol. Proc.,  
pág. 125.
- 212.- Miller, J.K., Hedberg, M. 1.965. Effects of cortisone on  
susceptibility of mice to Listeria monocytogenes. Am. J.  
Clin. Path., 43, 248 - 252.
- 213.- Morel, A. Lemeland, J.F., Boiron, H. 1.978. Intérêt de -

- la Séro - agglutination dans le diagnostic de la Listerio  
se. Medecine et maladies infectieuses, 8, 339 - 342.
- 214.- Murray, F.G.O., Webb, R.A., and Swann, M.B.R. 1.926. A -  
disease of rabbits characterized by large mononuclear leuco  
cytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus Bacte  
rium monocytogenes, n. sp., J. Pathol. Bacteriol., 29, --  
407 - 439.
- 215.- Nicheva, L., Manev, Ch. Studies on the haemolytic activi  
ty of Listeria innocua. Eight International Symposium on  
the Problems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. -  
ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.
- 216.- Nicholas, J.A., Pestre-Alexandre, P., Kirmaier, S., and -  
Taillandier, F. 1.972. Contribution a l'etude de la lis  
teriose, maladie alimentaire. Relation entre l'alimenta  
tion par l'ensilage et la listeriose ovine. Rev. Med. --  
Vet., 123, 61 - 70.
- 217.- Njoku-Obi, A.N.U. Serologic aspects of Listeriosis: the/  
antigen-fixation test. Second International Symposium on  
the Problems of Listeriosis. Montana 1.962. ed. Gray, -  
M.L. Bozeman: Artcraft. Printers.
- 217b.-Njoku-Obi, A.N.U., and Dennis, S.M. 1.972. Listeric - -  
abortion studies in sheep. Cornell. Vet., 62, 608 - 627.
- 218.- Nordland, O.S., 1.960. Host-parasite relations in initia  
tion of infection. II. Hyperglycemia and stress in expe  
rimental infection with Listeria monocytogenes. Canad. J.  
Comp. Med. Vet. Sci., 24, 57 - 64.
- 219.- North, R.J. 1.963. Some structural aspects of Listeria -  
monocytogenes. J. Ultrastruct. Res., 9, 187 - 197.
- 220.- North, R.J. 1.970. Suppression of cell mediated immunity

- to infection by an antimitotic drug. Further evidence -- that migrant macrophages express immunity. J. Exper. Med., 132, 535 - 540.
- 221.- Nyfeldt, A. 1.929. Etiologie de la Mononucleose infectieuse, n. sp., Compt. Rend. Soc. Biol., 101., 590 - 591.
- 222.- Nyfeldt, A. 1.930. Klinische und experimentelle Untersuchungen über die Mononucleosis infectiosa., n. sp., Folia Haematol. Leipzig, 47, 1 - 144.
- 223.- Olson, C., Rollins, C.L., Bagdonas, V., Blore, I.C., and Segre, D. 1.953. Distribution of Listeria monocytogenes in listeriosis of sheep. J. Infect. Diseases 93, 247 - 256.
- 224.- Olson, C. Jr., Dunn, L.A., and Rollins, C.L. 1.953. Methods for isolation of Listeria monocytogenes from sheep. Am. J. Vet. Res., 14, 82 - 85.
- 225.- Olson, C., Grace, O.D., Grace, O., and Blore, I.C. 1.957. Enhancement of listeriosis in sheep with material from bovine mucosal disease. Am. J. Vet. Res., 18, 303 - 309.
- 226.- Ortel, S. 1.971. Ausscheidung von Listeria monocytogenes in Stuhl gesunder Personen. Zbl. Bakt. Parasiten., 217, 41 - 46.
- 227.- Ortel, S. 1.981. Phage typing of Listeria monocytogenes. Eight International Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.
- 228.- Osebold, J.W., and Inouye, T. 1.954. Pathogenesis of Listeria monocytogenes infections in natural host. I. Rabbit studies. II Sheep studies. J. Infect. Diseases, 95, 52 - 78.

- 228b.-Osebold, J.W., and Sawter, M.T. 1.955. J. Bact., 70, - - 350 - 351.
- 229.- Osebold, J.W., Njoku Obi, A.N. 1.963. Resistance mechanisms in Listeriosis. Second International Symposium on the Problems of Listeriosis. Montana 1.962. ed. Gray, - M.L. Bozeman: Artcraft. Printers.
- 230.- Osebold, J.W., Dicapua, R.A. 1.968. Cellular Immunity of mice infected with Listeria monocytogenes in diffusion -- chambers. J. Bact., 95, 2158 - 2161.
- 231.- Otokunefor, T.V., Shum, D.T., and Galsworthy, S.D. 1.979. Immunological properties of partially purified material - with monocytosis-producing activity from Listeria monocytogenes. Can. J. microbiol., 25, 706 - 712.
- 232.- Pancheco, G. y Santos M.L. 1.957. Bacterioimpedencia de materias corantes sobre Listerias. Rev. Brasil. Med.,/ 14, 316 - 319.
- 233.- Paterson, J.S. 1.939. The present position regarding. -- Listerella monocytogenes infection in animals and man., - n. sp., Vet. Rec., 51, 873 - 876.
- 234.- Paterson, J.S. 1.940. The antigenic structure of orga- - nism of the genus Listerella, n. sp., J. Pathol. Bacte-- riol., 51, 427 - 436.
- 235.- Patocka, F., Mencikova, E., Seeliger, H.P.R., and Jirasek, A. 1.979. Neurotropic activity of a strain of Listeria - innocua in Suckling mice. Zbl. Bakt. Hyg., J. Abt. Orig. A., 243, 490 - 498.
- 236.- Pautard, B., Orfila, J. Perfection of a technique of in- direct immunofluorescence for the detection of anti-Liste- ria antibodies. Eight International Symposium on the Pro

blems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.

- 237.- Payá Vicens, M.J., comunicación personal.
- 238.- Payne, J.M. 1.958. Changes in the rat placenta and foetus following experimental infection with various species of bacteria. J. Pathol. Bacteriol., 75, 367 - 385.
- 239.- Pease, P.E. 1.967. Tolerated Infection With subbacterial phase of Listeria monocytogenes. Nature., 215, 936 -940.
- 240.- Pérez-Díaz, J.C., Vicente, M.F., Baquero, F. Plasmids in Listeria. Eighth International Symposium on the Problems/ of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.
- 241.- Pirie, J.H.H. 1927. A. new disease of veld rodents "Tiger River Disease". Publ. S. African. Inst. Med. Res., - 3, 163 - 186.
- 242.- Pirie, J.H.H. 1.940. Listeria: change of name for a genus of bacteria., n. sp., Nature, 145, 264.
- 243.- Pletneva, N.A., and Stiksova, V.N. 1.950. Glazozhelezis taia forma Listerella. Vest. Oftalmol., 29, 17 - 21.
- 244.- Poppensiek, G.C. 1.944. Listerellosis a case report., n. sp., J. Am. Vet. Med. Assoc., 105, 147 - 148.
- 245.- Potel, J. 1.950. Die Morphologie, Kultur and Tierpathogenität des Corynebacterium infantisepticum. Zbl. Bakt.-- Parasiten. Hyg. Abt. I. Orig., 56, 490 - 493.
- 246.- Prevot, A.R. Traite de systematique Bacterienne, Vol. 2, ed. Dunod, Paris 1.961.
- 247.- Racz, P., Tenner, K., and Kaiserling, E. Epithelial phase in Listeric infection. Sixth International Symposium on/

- the Problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974.  
ed. Woodbine, M. Leicester University Press 1.975.
- 248.- Ralovich, B., Forray, A., MÉRŐ, E. 1.970. Additional data on diagnosis and epidemiology of Listeria Infections./ Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 214, 231 - 235.
- 249.- Ralovich, B., Forray, A., MÉRŐ, E., MÁLOVICS, H., and SZÁZADOS, I. 1.971. New selective Medium for Isolation of/ L. monocytógenes. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 216, 88 - 91.
- 250.- Ralovich, B., Emődy, L., MÁLOVICS, I., MÉRŐ, E., and Forray, A. 1.972. Methods to Isolate Listeria monocytógenes from different materials. Act. microbiol. Acad. Sci. Hung., 19, 367 - 369.
- 251.- Ralovich, B., Emődy, L., MÁLOVICS, I., MÉRŐ, E., and Forray, A. 1.972. Biological properties of virulent and - avirulent L. monocytógenes strains. Acta microbiol. Acad. Sci. Hung., 19, 367 - 369.
- 252.- Ralovich, B. Selective and enrichment media to isolate - Listeria. Sixth International Symposium on the Problems/ of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University Press. 1.975.
- 253.- Ralovich, B., Audurier, A., Rocourt, J., Ortel, S., Angyal, T., Forray, A., Proksza, A., and Szemerédi, Gy. - 1.981. Incidence, Serotype and phage-type of L. monocytógenes strains isolated in Hungary. Eight International Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid, 1.981.
- 254.- Ralovich. Comunicación personal.

- 255.- Rappaport, F., Rabinovitz, M., Toaff, R., and Krochik, N. 1.960. Genital Listeriosis as a cause of repeated abortion. *Lancet* 7137, 1273 - 1275.
- 256.- Rigal, P, Barege, H., Morel, A., Rigal, M., Lemeland, J.F., et Boiron, H. 1.979. Antigenes solubles spcifiques et - typage de L. monocytogenes par electrosynerease. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur.* 130A, 189 - 193.
- 257.- Robertson, M.H. 1.977. Listeriosis. *Postgraduate Medical Journal.*, 53, 618 - 622.
- 258.- Robertson, M.H., Mussalli, N.G., Aizad, T.A., Okaro, J.M., and Banwell, G.S. 1.979. Two cases of perinatal Listeriosis: *Archives of Disease in child.*, 54, 549 - 562.
- 259.- Robin, L.A., and Magard, H. 1.960. Contribution au diagnostic bacteriologique des meningites a Listeria monocytogenes. *Ann. Inst. Pasteur.*, 99, 905 - 915.
- 260.- Robinson, K. The use of cell wall analysis and gel electrophoresis for the identification of coryneform bacteria Identification methods for Microbiologits. ed. Gibbs, B. M., and Shapton, D.A. Academic Press London. 1.968.
- 261.- Rocourt, J., Sehrettenbrunner, A., and Seeliger, H.P.R. - Isolation of Bacteriophages from Listeria monocytogenes - serovar 5 and Listeria innocua. Eight International Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid 1.981.
- 262.- Rodríguez Ferri, E.F. Comunicación personal.
- 263.- Rogul, M., and Alexander, A.D. 1.964. Characteristics - of Listeria monocytogenes soluble hemolysin. *Bacteriol. Proc.*, pag. 82.



- 264.- Rolle, M., and Mater, H. 1.956. Zur Pathogenese der Listeriose. Zbl. Bakt. Parasiten. Hyg. Abt. I. Orig., 166, 472 - 483.
- 265.- Romaña, C. 1.979. Listeriosis crónica: diagnóstico por inmunofluorescencia indirecta, en particular en la mujer embarazada. Pren. Med. argent., 66, 200 - 205.
- 266.- Roots, E., and Strauch, D. Listeriosen. Beiheft I. Zbl./Vet. Med. ed. Paul Parey. Berlin 1.958.
- 267.- Roussel-Delvallez, M., Carlier, Y., Courcol. R., and Martin, G. Enzyme Linked Immunosorbent assay applied to serodiagnosis of human Listeriosis. Eigth International -- Symposium on the problems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid - 1.981.
- 268.- Sale, G., Seaman, A., and Woodbine, M. An approach to -- multiple synergism of L. monocytogenes. Seventh International Symposium on the Problems of Listeriosis. Varna, - September, 1.977. ed. Ivanov, I. Sofia 1.979.
- 269.- Sarrut, S. et Alison, F., 1.967. Etude du placenta dans/ 21 cas de Listeriose congenitale. Arch. Franc. Ped., 24, 285 - 302.
- 270.- Sato, I., Tanaka, T., Saito, K., Mitsuhashi, S. 1.962 - Cellular basis of immunity. II. Cross immunity of the - mouse mononuclear phagocytes immunized with live vaccine of Salmonella enteritidis against S. typhimurium, - S. choleraesuis, E. coli, and Mycobacterium tuberculosis. Proc. Japan. Acad., 38, 133 - 142.
- 271.- Scgoop, G. 1.946. Metritis infectiosa tragender Angorahäsinnen. Deut. Tierärztl. Wochschr., 53, 42 - 43.
- 272.- Schultz, E.W., Terry, M.C., Brice, A.T., and Gebhardt, - L.P. 1.934. Bacteriological observations on a case of - meningo-encephalitis., n. sp., Proc. Soc. Exp. Biol. -- Med. 3, 1.021 - 1.023.
- 273.- Schultz, E.W., Terry, M.C., Brice, A.T., and Gebhardt, L.

- P. 1.938. Listerella monocytogenes: a cause of meningo-encephalitis in man, n. sp., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 38, 605 - 608.
- 274.- Schultz, E.W. 1.945. Listerella infections, n. sp., Stanford. Med. Bull. 3, 135 - 151.
- 275.- Schultz, W. 1.958. Die diaplazentare Infektion in Tierexperiment. Geburtsh. Frauenheilk, 18, 315 - 318.
- 276.- Schultz, G. 1.967. Zbl. Vet. Med. 22, 766 - 768.
- 277a.- Seeliger, H.P.R. Listeriose. ed. Barth, J.A. Leipzig. - 1.955.
- 277b.- Seeliger, H.P.R., and Linzenmeier, G. 1.955. Ann. Inst./Past. 88, 127 - 128.
- 278.- Seeliger, H.P.R. Listeriosis. ed. Hofner Publishing Co./Inc. 2 nd. ed. New York 1.961.
- 279.- Seeliger, H.P.R. 1.962. Die Ätiologische Diagnose des -- Listeriose. Zbl. Bakt. Parasiten. Hyg. Abt. I. Orig., -- 187, 267 - 277.
- 280.- Seeliger, H.P.R., Sander, F., and Bockemühl, J. 1.970. -- Zbl. Med. Mikrobiol. and Immunol., 155, 352 - 368.
- 281.- Seeliger H.P.R. 1.972. Serotypes of L. monocytogenes and other Listeria species. Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung., 29, 273 - 286.
- 282.- Seeliger, H.P.R. Serovars of Listeria monocytogenes and -- other Listeria Species. Sixth International Symposium on the Problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, Leicester University Press 1.975.
- 283.- Seeliger, H.P.R., and Schoois, M. Serological Analysis - of non-hemolyzing Listeria strains belonging to a Spe-

- cies different from Listeria monocytogenes. Seventh International Symposium on the Problems of Listeriosis. Varna, September, 1.977. ed. Ivanov. I. Sofia 1.979.
- 284.- Seeliger, H.P.R., and Hühne, K., 1.979. Serotyping of -- Listeria monocytogenes and related species. Meth. in Microbiol., 13, 31 - 49.
- 285a.-Seeliger, H.P.R., Sehrettenbrunner, A., and Rocourt, J. - Serological and biochemical studies on Listeria monocytogenes. Serovar 5. Eight International Symposium on the Problems of Listeriosis. Varna, September 1.977. ed Ivanov. I. Sofia 1.979.
- 285b.- Seeliger, H.P.R. Microbiology ed. Braude, A. I., W. B., - Saunders Company, Philadelphia 1.982.
- 286.- Shahamat, M., and Woodbine, M. Synergic control of Listeria monocytogenes. Seventh International Symposium on the Problems of Listeriosis. Varna, September 1.977. ed. Ivanov. I. Sofia 1.979.
- 287.- Shimizu, K., Otsuka, G., and Oka, M. 1.954. Guanofuracin media for isolation of L. monocytogenes and its practical application. Japan. J. Vet. Res. 2, 1 - 10.
- 288.- Shum, D.T., and Galsworthy, S.B. 1.979. Stimulation of/ monocyte precursor in vivo by an extract from Listeria monocytogenes. Can. J. Microbiol. 25, 698 - 705.
- 289.- Simon, C. 1.956. Möglichkeiten zur Anreicherung von Listeria monocytogenes in flüssigen Vorkulturen. Zbl.Hyg.- - 143, 159 - 172.
- 290.- Simon, H.B., Sheagren, J.N. 1.971. Cellular immunity in/ vitro I. Immunologically mediated enhancement of macrophage bactericidal capacity. J. Expert. Med., 33, 1377-1385.

- 291.- Smpson, J.F. 1.971. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 34,/  
657 - 663.
- 292.- Sipka, H., Stajner, B., and Zakula, S. 1.973. Vet. Bull.  
43, 486 - 488.
- 293.- Smith, E.M., Gray, M.L., and Thorp, F. Jr. 1.957. Reac--  
tion of splenic tissue in culture to Listeria monocytoge-  
nes. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 94, 162 - 166.
- 294.- Smith, C.W., and Metzger, J.F. 1.962. Demonstration of/  
a capsular structure on Listeria monocytogenes. Pathol. -  
Microbiol., 25, 499 - 506.
- 295.- Sndecor, G.W., y Cochran, W.G., Metodos estadisticos, -  
ed. Campaña Editorial Continental, 3ª ed. Mexico 1.975.
- 296.- Sohler, F., Benazet, F. et Piéchand, M. 1.948. Sur un -  
germe du genre Listeria apparement non pathogene., Ann. -  
Inst. Past., 74, 54 - 57.
- 297.- Sokal, R.R., y Rohlf, F.J., Biometría principios y méto-  
dos estadísticos en la investigación biológica, ed. H. --  
Blume Ediciones, Madrid 1.979.
- 298.- Sorensen, G.H. 1.975. Peptococcus (S. Micrococcus) indo-  
licus the demonstration of two varietes of hemolysin for--  
ming Strains. Acta Vet. Scand., 16, 218 - 225.
- 299.- Stanek, O.G., and Rotter, M. Studies on patient's serum/  
containing extremely high Listeria monocytogenes H-anti-  
body titers lacking O-antibody titers. Eight Internatio-  
nal Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, -- ,  
September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. -- -  
Madrid. 1.981.
- 300.- Stabley, N.F. 1.949. Studies on Listeria monocytogenes -  
I. Isolation of a monocytosis producing agent (MPA). - -

- Australian J. Exptl. Biol. Med., 27, 123 - 131.
- 301.- Stuar, S.E., and Welshimer, H.J. 1.974. Taxonomic reexamination of Listeria Pirie and transfer of Listeria grayi and Listeria murrayi to a new genus Murraya. Int. J. Syst. Bacteriol., 24, 177 - 185.
- 302.- Suárez, G., Domínguez, L., Mamolar, A. Contribución al estudio del aislamiento de microorganismos del género Listeria. Sociedad española de microbiología. IV Reunión Científica de la Sección Regional del Noroeste. Salamanca 1.978.
- 303.- Suárez, G., Mamolar, A., Domínguez, L. Aislamiento de microorganismos del género Listeria en ganado ovino y bovino y relación con el título de anticuerpos en el suero sanguíneo. Sociedad española de microbiología. IV Reunión Científica de la Sección Regional del Noroeste. Salamanca 1.978.
- 304.- Suchanova, M., and Patocka, F. 1.957. Pokus o dosezení L forem L. monocytogenes. Czech. Epidemiol. Mikrobiol. -- Immunol., 6, 133 - 139.
- 305.- Suchanova, M., Mencikova, E., Patocka, F., and Benesova, D. 1.958. Experimentelle Listeriose der Kaninchen. Verlauf der experimentalen Infektion und Studium ihrer Übertragung von der Mutter auf die Frucht. Zbl. Bakt. Parasiten. Abt. I. Orig., 170, 547 - 564.
- 306.- Sword, C.P., and Pickett. 1.961. Isolation and distribution of bacteriophages from Listeria monocytogenes. J. -- Gen. Microbiol., 25, 241 - 248.
- 307.- Topley and Wilson's. Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. ed. Edward Arnold. 6th ed., London. -- 1.975.

- 308.- Touraine, J.L., Revillard, J.P., Traeger, J. 1.972. Bio-  
logie de l'infection listérienne. Influence de l'immunode  
préssion. Nouv. Presse. Méd. I, 42, 2827 - 2832.
- 309.- Touraine, J.L., Toussaint, D., Blanc, N., Traeger, J. - -  
1.972. Listériose après transplantation rénale. Nouv. --  
Presse. Méd. I., 42, 2813 - 2817.
- 310.- Tripathy, S.P., Mackaness, G.B. 1.969. The effect of --  
cytotoxic agents on the passive transfer of cell-mediated  
immunity. J. Exper. Med., 130, 17 - 22.
- 311.- Trivett, T.L., and Meyer, E.A. 1.971. Citrate cycle and  
related metabolism of Listeria monocytogenes. J. Bacte- -  
riol., 107, 770 - 779.
- 312.- Truitt, G.L., and Mackaness, G.B., 1.971. Rev. resp. --  
Dis., 104, 829 - 843.
- 313.- Vizcaino, L., y Miranda Garcia, A. 1.974. A note on Lis  
teria milk excretion in sero-positive apparently healthy/  
cows. Sixth International Symposium on the Problems of -  
Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine,  
M. Leicester University Press 1.975.
- 314.- Watson, B.B., and Eveland, W.C. 1.965. The application -  
of phage-fluorescent antiphage staining system in speci--  
fic identification of Listeria monocytogenes. I Species -  
specificity and immunofluorescent sensitivity of Listeria  
monocytogenes phage observed in smear preparation. J. In-  
fect. Diseases, 115, 363 - 369.
- 315.- Webb, R.A., and Barber, M. 1.937., n. sp., J. Pathol. Bac-  
teriol., 45, 523 - 539.
- 316.- Weinstein, L., and Kaplan, K. 1.970. The cephalosporins  
a review of microbiological, chemical and pharmacological

- properties and their use in the chemotherapy of infection. Ann. Intern. Med., 72, 729 - 739.
- 317.- Weinstein, M.J., Luedemann, G.M., Oden, E.M., and Wagman, G.H. Gentamicin, a new broad spectrum antibiotic complex. ed. Silvester, J.C. American Society for Microbiology, Ann. Arbor, Michigan 1.964.
- 318.- Weinstein, L. Quimioterapia de las enfermedades microbianas.
- 319.- Weinstein, L., and Dalton, A.C. 1.968. Host determinants of response to antimicrobial agents. New Engl. J. Med., 279, 467 - 473.
- 320.- Weis, J. The incidence of Listeria monocytogenes in domestic and wild animals in south. West. Germany. Sixth International Symposium on the Problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester/University Press 1.975.
- 321.- Welshimer, H.J., and Meredith, A. 1.971. Listeria murrayi sp. n.: nitrate-reducing mannitol fermenting Listeria Int. J. Syst. Bacteriol., 21, 3 - 7.
- 322.- Welshimer, M.J. Listeria in nature. Sixth International Symposium on the Problems of Listeriosis. Nottingham, -- September 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester University/Press 1.975.
- 323.- Wilkinson, B.J., and Jones, D. Some serological studies on Listeria and possibly related bacteria. Sixth International Symposium on the Problems of Listeriosis. Nottingham, September 1.974. ed. Woodbine, M. Leicester -- University Press 1.975.

- 323b.-Wilkinson, B.J., and Jones, D. 1.977. *Listeria* taxonomy. *Journal of General Microbiology*, 98, 399 - 421.
- 324.- Wilson, G.S. and Miles, A.A. Topley and Wilson's principles of Bacteriology and immunity. 3rd. ed. vol. 1. ed./Williams and Wilkins co. Baltimore. 1.946.
- 325.- Winslow, D.L., and Pankey, G.A. In vitro Activity of antimicrobial combinations containing rifampin or trimethoprim against Listeria monocytogenes. Eight International Symposium on the Problems of Listeriosis. Madrid, September 1.981. ed. Centro Especial Ramón y Cajal. Madrid 1.981.
- 326.- Wramby, G.O. 1.944. Om Listerella monocytogenes bakteriologi och om förekomst av Listerellainfection hos djur, n. sp., *Scand. Vet. Tidskr.*, 34, 278 - 290.
- 327.- Zachar, and Savage, C. 1.979. Microbiol interference and colonization of the murine gastrointestinal tract by Listeria monocytogenes. *Infection and Immunity*, 23, 168 - 174.
- 328.- Zink, A., Mello, G.O., and Burkhart, R.L. 1.951. Listeriosis-Field and laboratory studies, and aureomycin activity. *Am. J. Vet. Res.*, 12, 194 - 198.

